



**Université de Liège**

**Département des Sciences de la Vie**



**Faculté des Sciences**

**Laboratoire d'Angiogenèse Moléculaire**

# Détermination du rôle de l'uPAR dans l'angiogenèse

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ PAR**

**Pollenus Thomas**

En vue de l'obtention du grade de  
Master en Biochimie et Biologie Moléculaire

À finalité approfondie

Année Académique 2013-2014

*Ce mémoire n'aurait pas pu se dérouler aussi bien sans le concours de plusieurs personnes que je tiens à remercier.*

*Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur I. Struman de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir proposé ce projet dans lequel je me suis investi. Je tiens également à la remercier pour sa disponibilité, son enthousiasme et ses conseils. Tant d'éléments qui ont contribué à la bonne réalisation de mon mémoire.*

*J'aimerais également remercier Cécile Paques sans qui ce mémoire n'aurait pas eu lieu. Merci à elle pour son encadrement, son soutien, ses nombreux et précieux conseils ainsi que pour sa bonne humeur. Je tiens enfin à la remercier de m'avoir transmis sa passion et de m'avoir appris ce qu'est véritablement « La Recherche Scientifique ».*

*Merci à Michelle et Olivier pour leur disponibilité, leur gentillesse, leur aide et leurs conseils pratiques.*

*Merci à l'ensemble du LAM de m'avoir accueilli aussi gaiement. Je tiens plus particulièrement à remercier Nicolas, Stella, Jennifer et Marie pour la bonne ambiance instaurée au sein de notre équipe.*

*Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour leur soutien tout au long de mes 5 années d'étude et plus particulièrement mes parents, mon frère, Ingrid et Arnaud qui ont su s'intéresser de près ou de loin à mes études et qui m'ont permis de garder confiance dans des moments plus difficiles.*

## Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANG-1	Angiopoïétine-1
ANG-2	Angiopoïétine-2
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATF	<i>Amino Terminal Fragment</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
BAD	<i>Bcl-2 Associated Death Promotor</i>
BAEC	<i>Bovin Aortic Endothelial Cells</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAV-1	<i>Caveolin-1</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
EEA-1	<i>Early Endosome Antigen-1</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
Flk-1	<i>Fetal liver kinase 1</i>
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
FRS2	<i>FGFR Substrat 2</i>
GAB1	<i>GRB2 Associated Binding Protein 1</i>
GFD	<i>Growth Factor Domain</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GRB2	<i>Growth factor Receptor Bound 2</i>
HBEGF	<i>Heparin Binding EGF-like Growth Factor</i>

HGF	<i>Hepatocyte-Growth Factor</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HPSG	<i>Heparan Sulfate</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IP3	<i>Inositol triphosphate</i>
Jak	<i>Janus kinase</i>
kDa	<i>KiloDalton</i>
KDR	<i>Kinase Domain-containing Receptor</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LRP-1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1</i>
M $\beta$ CD	<i>Methyl-<math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	<i>Matrice extracellulaire</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
NOS	<i>Oxide nitric synthase</i>
NRP-1	<i>Neuropilin-1</i>
PA	<i>Plasminogen Activator</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PC	<i>Péricyte</i>
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor-BB</i>
PDK	<i>Phosphoinositide Dependent Kinase</i>
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 Kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol diphosphate</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PLC $\gamma$	<i>Phospholipase C<math>\gamma</math></i>
Plg	<i>Plasminogène</i>

PlGF	<i>Placental Growth Factor</i>
Pln	Plasmine
PRL 16K	Prolactine 16K, Fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>
PTP1b	<i>Protein Tyrosin Phosphatase 1b</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFM	<i>Serum Free Medium</i>
SH2	<i>Src Homology 2 domain</i>
SMB	Somatomédine B
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i>
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
tPA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>urokinase-type Plasminogen Activator</i>
uPAR	<i>urokinase-type Plasminogen Activator Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VRAP/TSAd	<i>VEGFR-Associated Protein/T-cell Specific Adaptator molecule</i>

# Table des matières

<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.	<i>L'angiogenèse</i>	1
1.1.	Mécanisme et régulation de l'angiogenèse	1
1.2.	L'angiogenèse tumorale	2
2.	<i>Les lipid rafts</i>	4
2.1.	La composition	4
2.2.	Les <i>rafts</i> planaires et les <i>caveolae</i>	5
3.	<i>Les facteurs de croissance et leurs récepteurs</i>	6
3.1.	La famille du VEGF	6
3.1.1.	Le VEGFR2	8
3.1.2.	Le trafficking du VEGFR2	9
3.2.	La famille du FGF	11
3.2.1.	Les récepteurs FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptors)	11
3.2.2.	Le trafficking du FGFR	13
3.3.	La famille de l'EGF ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )	14
3.3.1.	EGFR (Epidermal Growth Factor receptor)	15
3.3.2.	EGFR et cancer :	16
4.	<i>L'uPAR (Urokinase Plasminogen Activator Receptor)</i>	16
4.1.	Le système plasminogène/plasmine	16
4.2.	L'uPA	17
4.3.	L'uPAR	17
4.3.1.	Le trafficking de l'uPAR	18
4.3.2.	L'uPAR et l'angiogenèse	19
<b>II.</b>	<b>Matériels et méthodes</b>	<b>20</b>
1.	<i>Solutions, tampons et réactifs</i>	20
1.1.	Solutions et tampons	20
1.2.	Anticorps	20
1.2.1.	Anticorps primaires	20
1.2.2.	Anticorps secondaires	21
1.3.	Réactifs	21
2.	<i>Culture cellulaire</i>	21
3.	<i>Transfection des cellules</i>	22
4.	<i>Tests fonctionnels</i>	23
4.1.	Test de prolifération BrdU	23
4.2.	Test de prolifération WST-1	23
4.3.	Test de migration	24
5.	<i>Immunohistochimie</i>	24
6.	<i>Proximity ligation assay (PLA)</i>	25

7. Immunoprécipitation	26
8. Préparation d'extraits protéiques totaux	26
9. Western blotting	27
10. Extraction des fractions membranaires	28
11. Quantification des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)	28
11.1. Transcription inverse	29
11.2. PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR green	29
<b>III. Objectif du travail</b>	<b>30</b>
<b>IV. Résultats</b>	<b>31</b>
1. Etude des complexes VEGFR2/uPAR, FGFR1/uPAR et EGFR/uPAR	31
2. Etude de l'implication de l'uPAR dans les effets pro-angiogènes du VEGF, du bFGF et de l'EGF	32
2.1. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur le niveau protéique et sur le niveau de l'ARN messager de l'uPAR dans les cellules HUVEC	32
2.1.1. Analyse de la diminution protéique par Western blotting	32
2.1.2. Analyse de la diminution des ARN messagers uPAR par qRT-PCR	33
2.2. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la prolifération induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF	34
2.3. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la migration induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF	35
2.4. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la survie cellulaire induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF	36
3. Etude de l'implication de l'uPAR dans les voies de signalisation du bFGF, et du VEGF	37
4. Etude de la localisation d'uPAR à la surface des cellules endothéliales	38
5. Etude de la localisation membranaire du FGFR1 et du VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales	39
6. Etude de l'importance des lipid rafts dans la formation des complexes FGFR1/uPAR, et VEGFR2/uPAR	41
7. Etude de l'implication des lipid rafts dans les voies de signalisation du bFGF, du VEGF, et de l'EGF	42
<b>V. Discussion et conclusion</b>	<b>43</b>
1. Discussion	43
2. Conclusion générale	47
<b>VI. Bibliographie</b>	<b>49</b>

# I. Introduction

## 1. L'angiogenèse

La survie des cellules de mammifères nécessite de l'oxygène et des nutriments dont le transport est assuré par les vaisseaux sanguins. Au cours de l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins se développent par l'intermédiaire de la vasculogenèse et de l'angiogenèse. Le premier processus se déroule uniquement pendant cette période et implique la différenciation de cellules endodermiques en angioblastes puis en cellules endothéliales (CE). Ces dernières coopèrent afin d'établir un premier réseau vasculaire primitif. A la suite de ce phénomène, l'angiogenèse débute. Il s'agit de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Tout ceci aboutit à l'établissement d'un réseau beaucoup plus complexe et organisé comprenant également d'autres types cellulaires indispensables. En effet, les péricytes et les cellules musculaires lisses participent à la stabilisation des cellules endothéliales mais également à la régulation du flux sanguin (Jain 2003, Carmeliet and Jain 2011) (**Figure 1**). Ce processus est appelé l'artériogénèse.

Une fois le réseau vasculaire abouti, au terme de l'embryogenèse, les cellules endothéliales sont généralement dans un état quiescent. Cependant, certains événements physiologiques comme la cicatrisation, la vascularisation de l'endomètre ou du placenta et l'adaptation à l'exercice musculaire nécessitent un processus d'angiogenèse. Elle peut aussi être impliquée dans certaines maladies comme le cancer, plus particulièrement lors du développement tumoral.

### 1.1. Mécanisme et régulation de l'angiogenèse

Les mécanismes de régulation de l'angiogenèse sont complexes et impliquent la prolifération, la différenciation, la migration des cellules endothéliales et l'établissement d'un réseau vasculaire. Ce phénomène est caractérisé par une dilatation des vaisseaux, par une augmentation de la perméabilité vasculaire, et par la dégradation de la membrane basale déposée par les péricytes et les CE. De nombreux facteurs pro- (*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), etc) et anti-angiogènes (Angiopoïétine-1 (ANG-1), prolactine 16K, angiostatine, thrombospondine, etc) contrôlent ces phénomènes. Leur abondance relative mène soit à la quiescence des vaisseaux (facteurs anti-angiogènes en excès) ou, au contraire, active la formation de nouveaux vaisseaux (facteurs pro-angiogènes en excès). Ces facteurs sont produits par les cellules endothéliales, elles-mêmes, mais aussi par les cellules des tissus en croissance.



Suite à un stimulus pro-angiogène, certaines cellules endothéliales deviennent capables de se mouvoir, il s'agit des cellules *tip*. Elles possèdent de nombreux filopodes leur permettant de diriger leur migration vers les stimuli. A la base de ces cellules *tip*, se différencient les cellules *stalk*. Ces dernières prolifèrent de manière importante pour augmenter la taille du nouveau vaisseau. Ensuite, la lumière du tube est créée soit par coalescence de vacuoles intracellulaires, soit par fusion des membranes de deux cellules endothéliales adjacentes (Potente et al. 2011).

Suite à cette première phase de l'angiogenèse, la prolifération et la migration sont inhibées et la membrane basale est reconstituée. Les cellules adhèrent plus fortement les unes aux autres, deviennent quiescentes et les cellules murales (péricytes (PC) et *Smooth Muscle Cells* (SMC)) viennent stabiliser la structure (**Figure 2**) (Potente et al. 2011). Ces cellules murales sont recrutées par les cellules endothéliales grâce à la sécrétion d'ANG-1, de PDGF-BB (*Platelet-Derivated Growth Factor-BB*) ou encore de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Ces différents types cellulaires collaborent (par des interactions CE/CE, CE/cellules murales et CE/MEC (matrice extracellulaire)) pour former la lame basale et générer la matrice extracellulaire environnante. Le rôle du TGF- $\beta$  est multiple : il est à la fois impliqué dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes et en SMC mais également dans la formation de la MEC et surtout dans l'inhibition de sa dégradation via la stimulation de la production de PAI-1 (Lebrin et al. 2005). Les cellules sont alors capables de survivre plusieurs années grâce à l'expression autocrine de nombreux facteurs de survie (VEGF, intégrines, ANG-1, FGF, EGF,...). De plus, la présence des péricytes et des SMC permet de réprimer la prolifération des CE et de maintenir leur survie par l'intermédiaire des divers facteurs angiogènes. La coopération des différents types cellulaires permet l'établissement des vaisseaux sanguins matures.

## 1.2. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est une étape cruciale dans la croissance tumorale et le développement des métastases car elle permet de créer un réseau de vaisseaux sanguins capable de fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules cancéreuses. Sans un tel réseau de capillaires, la taille d'une tumeur ne peut excéder 1-2 mm<sup>3</sup>. En deçà de ce volume, les cellules obtiennent leurs ressources par simple diffusion. Une tumeur correspond à un ensemble de cellules ayant accumulé un certain nombre de mutations leur permettant de proliférer de manière plus importante. Cependant, l'absence de vaisseaux sanguins et donc de ressources en suffisance limite cette prolifération. Cette phase primaire du développement tumoral est appelée la phase dormante ou avasculaire. Quand une tumeur grossit suite à un excès de prolifération au-delà de cette limite, la nutrition par diffusion n'est plus suffisante et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est indispensable ; l'angiogenèse est déclenchée (Yang et al. 2013). Ceci marque le début

de la phase invasive caractérisée par une croissance tumorale exponentielle. En plus de cette augmentation de volume, la tumeur peut générer et disséminer des métastases via ce nouveau réseau de capillaires. Par conséquent, l'angiogenèse constitue une étape cruciale dans la prolifération et l'expansion tumorales.

Les cellules tumorales sont dotées de la capacité de produire des facteurs pro-angiogènes. C'est une balance entre les facteurs pro- et anti-angiogènes qui détermine si oui ou non il y aura formation de nouveaux vaisseaux. Dans le cas de la prolifération tumorale, cette balance subit un déséquilibre vers les facteurs pro-angiogènes. Ce déséquilibre menant au *switch* angiogène est donc à la base de l'angiogenèse tumorale (**Figure 3**) (Hanahan and Folkman 1996, Carmeliet and Jain 2000).

Les cellules cancéreuses ne vont pas directement induire la formation de vaisseaux sanguins. Dans un premier temps, elles produisent beaucoup d'angiopoïétine-2 (ANG-2) qui est un antagoniste de l'angiopoïétine-1 (ANG-1), engendrant ainsi une perte d'intégrité des vaisseaux préexistants aux alentours de la tumeur. Ceci mène à un état d'hypoxie au sein de la tumeur. Suite au manque d'oxygène, les cellules tumorales produisent le facteur HIF-1 (*Hypoxia Induced Factor-1*). Ce facteur conduit à l'activation de gènes codant des facteurs pro-angiogènes qui sont sécrétés par les cellules tumorales et stimulent les CE à débiter l'angiogenèse. Parmi ces gènes, il y a notamment ceux des facteurs de croissance (FGF, VEGF, PDGF-B,...), mais également celui codant l'oxyde nitrique synthétase permettant la croissance des capillaires. L'oxyde nitrique synthétase est également capable de réguler l'expression du VEGF (Milkiewicz et al. 2006, Yang et al. 2013). Le VEGF joue un rôle central dans l'angiogenèse tumorale : il permet notamment d'initier la dilatation des vaisseaux et d'en augmenter leur perméabilité en agissant sur les molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (PECAM, VE-cadhérine, claudines,...) (Carmeliet and Jain 2011). Tout ceci mène à l'extravasation de protéines plasmatiques et des CE favorisant alors les diverses étapes de l'angiogenèse.

Un autre élément crucial dans l'angiogenèse physiologique et tumorale est la dégradation de la matrice extracellulaire. Celle-ci est conduite par une dégradation protéolytique via les MMP (*Matrix metalloproteases*). Il s'agit de protéases dépendantes du zinc et dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire. Cette dégradation libère les différents facteurs et les cellules, permettant dès lors de favoriser la migration des cellules endothéliales. Un autre système de dégradation est tout aussi important. Il s'agit du système de l'*urokinase plasminogen activator* (uPA) et de son récepteur (uPAR). L'uPA, par liaison à son récepteur, catalyse une réaction de dégradation de la forme inactive du plasminogène en une forme active qu'est la plasmine. Cette dernière est responsable de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire

mais également de l'activation de plusieurs MMP (Milkiewicz et al. 2006, Tang and Han 2013). Ce système sera discuté de manière approfondie plus loin dans cette introduction.

Lors de l'angiogenèse physiologique, l'activité du VEGF et des autres facteurs pro-angiogènes est fortement régulée. Divers inhibiteurs permettent d'empêcher un excès d'angiogenèse. Lors du développement d'une tumeur, ce système de régulation est perturbé. La présence de facteurs pro-angiogènes en excès mène à l'apparition d'anomalies au niveau des vaisseaux sanguins. De plus, il semble que les capillaires tumoraux présentent moins de cellules périvasculaires (péricytes). La réponse des vaisseaux à un changement de disponibilité en oxygène et en nutriments est donc perturbée. Par conséquent, l'angiogenèse tumorale mène à un développement d'un réseau de vaisseaux désordonnés favorisant la dissémination de métastases (Xian et al. 2006, Gerhardt and Semb 2008).

Il a été montré que les cellules endothéliales sont riches en *lipid rafts*. Ces domaines sont également très importants dans le développement tumoral et constitue une cible intéressante pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses. (Massey and Schnitzer 2010).

## 2. Les *lipid rafts*

Le modèle de la mosaïque fluide, proposé par Singer-Nicholson comme modèle de représentation de la membrane plasmique, est toujours d'actualité. Cependant, il se complexifie au fur et à mesure des découvertes, notamment avec celle des *lipid rafts*. Ces nouveaux éléments membranaires ont été découverts lors de l'étude de la polarité des cellules épithéliales et sont caractérisés par la présence abondante de sphingolipides et de cholestérols. Ces domaines sont localisés dans le feuillet exoplasmique (Simons and Toomre 2000). La présence des cholestérols confère à ces domaines une rigidité plus importante que le reste de la membrane. Une autre particularité de ces *lipid rafts* est leur capacité à inclure mais aussi à exclure différentes protéines.

### 2.1. La composition

Les *lipid rafts* sont des domaines membranaires résistants aux détergents tels que le Triton X-100. Ils sont composés majoritairement de sphingolipides mais également de cholestérols. Ces derniers servent principalement d'agents créant des espaces entre les sphingolipides. Ceux-ci interagissent latéralement les uns avec les autres. Bien qu'ils soient considérés comme des zones plus rigides de la membrane, ces microdomaines n'en sont pas moins dynamiques. En effet, les *rafts* peuvent associer mais aussi dissocier diverses protéines de signalisation et ainsi moduler leurs fonctions. Parmi ces protéines, il y a celles accrochées à la membrane par une ancre GPI (*Glycosylphosphatidylinositol*) et les transmembranaires, dont un grand nombre de tyrosines kinases faisant partie de la famille Src (Simons and Ikonen 1997).

La difficulté à isoler les *rafts* rend leur étude et leur classification complexes. Cependant, deux types de *rafts* peuvent être distingués ; les *rafts* dits planaires et les *caveolae* (Staubach and Hanisch 2011).

## 2.2. Les *rafts* planaires et les *caveolae*

Depuis quelques années, les *rafts* sont de plus en plus étudiés pour leur implication dans la signalisation cellulaire. Il semble que les échanges de protéines entre les *rafts* et les non *rafts* constituent un système de modulation de la signalisation membranaire (Staubach and Hanisch 2011). Ces microdomaines membranaires sont des zones permettant de concentrer les protéines afin de faciliter les interactions entre les divers partenaires de signalisation (Simons and Ikonen 1997). Cela permet d'amener un récepteur dans un nouvel environnement membranaire susceptible d'initier et de moduler sa signalisation. Ensuite, les microdomaines permettent de protéger les protéines de l'action d'enzymes non *rafts* telles que des phosphatases.

Il existe trois hypothèses expliquant la façon dont les récepteurs s'intègrent et interagissent au sein de ces microdomaines. Selon la première, les récepteurs sont présents à l'équilibre dans les *lipid rafts* ce qui permet au ligand de venir s'y fixer et d'activer le récepteur. Une deuxième hypothèse voudrait que la liaison du ligand se fasse à l'extérieur des domaines et conduise à une oligomérisation permettant une augmentation de l'affinité des récepteurs pour les *rafts*. Enfin, selon la troisième hypothèse, les récepteurs présents dans les radeaux lipidiques sont capables d'interagir avec des protéines de *crosslink* permettant de rassembler plusieurs *rafts* les uns à côtés des autres pour former des clusters de grande taille (**Figure 4**). D'après la littérature, ces hypothèses ne s'excluent pas et peuvent être vérifiées toutes les trois. Un exemple de signalisation déclenchée par les *rafts* est la signalisation via Ras menant à l'activation de la voie ERK/MAPK (Simons and Toomre 2000). Une fois Ras activée, elle peut recruter les sérine/thréonine kinases de la famille Raf qui sont capables d'activer, à leur tour, la voie des ERK-MAPK. Il existe deux types de Ras, H-Ras et K-Ras. H-Ras étant palmytoylé, il se localise préférentiellement dans les *rafts* alors que K-Ras, possédant une région polybasique, est distribuée dans la membrane plasmique. La perturbation des *lipid rafts* (methyl- $\beta$ -cyclodextrine ou mutant dominant négatif pour la cavéoline) inhibe la voie activée par H-Ras mais pas celle initiée par K-Ras (Roy et al. 1999)

Ces entités membranaires sont également impliquées dans des phénomènes d'endocytose et de transcytose. Ces endocytoses peuvent être clathrine-dépendantes mais également clathrine-indépendantes. Elles sont fortement régulées par la présence de la cavéoline-1 et du cholestérol (Lajoie and Nabi 2010, Staubach and Hanisch 2011).

Les radeaux lipidiques sont fortement impliqués dans l'apoptose, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires ; processus importants lors de l'angiogenèse (Raghu et al 2010). Ces entités membranaires jouent donc un rôle important dans les phénomènes régulant l'angiogenèse. Il a notamment été montré qu'elles sont des zones de régulation et de concentration de divers récepteurs membranaires tels que les récepteurs à tyrosines (Liu et al. 1997, Staubach and Hanisch 2011). Un des objectifs de ce travail sera de mettre en évidence l'implication des *rafts* dans les phénomènes angiogènes.

### 3. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs

Les facteurs de croissance sont des molécules capables de réguler divers processus tels que la prolifération, la croissance, la migration mais aussi la différenciation cellulaires. Ils sont donc considérés comme des régulateurs clés de nombreux processus physiologiques et notamment de l'angiogenèse. Le terme « facteur de croissance » englobe de nombreuses familles de protéines de différentes tailles parmi lesquelles on retrouve l'EGF (Epidermal Growth Factor), le VEGF, le FGF mais aussi l'angiopoïétine, le PDGF, les TGF- $\alpha$  et - $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$  et - $\beta$* ), l'IGF (*Insulin-like Growth Factor*), etc.

Les facteurs de croissance ne sont pas capables, à eux seuls, de réguler les processus qui leur sont associés. En effet, ils doivent d'abord interagir avec leurs récepteurs afin d'activer les différentes voies de signalisation menant à la réponse cellulaire. Dans de nombreux cas, ces récepteurs font partie de la grande famille des RTK (*Receptor Tyrosin Kinase*). Pour la plupart d'entre-eux, la liaison à leur facteur de croissance engendre une oligomérisation favorisant une autophosphorylation des tyrosines du domaine kinase ou du domaine juxtamembranaire. Ce phénomène engendre des changements de conformation qui permettent de stabiliser le récepteur et d'activer son domaine kinase. Les tyrosines ainsi phosphorylées servent de site d'ancrage pour divers enzymes ou protéines adaptatrices présentant des domaines SH2 (*Src Homology-2*) ou PTB (*Phosphotyrosine Binding*). La propagation du signal est ainsi assurée à l'intérieur de la cellule (Hubbard and Miller 2007).

Les familles du VEGF, du FGF et de l'EGF, en association avec leurs récepteurs respectifs, sont fortement impliquées dans l'angiogenèse (Gerwins et al. 2000, Barrientos et al. 2008).

#### 3.1. La famille du VEGF

La famille du VEGF est une grande famille constituée d'au moins six facteurs : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le facteur de croissance placentaire (PlGF). Tous ces acteurs sont des polypeptides présents, *in vivo*, sous la forme d'homodimères. Il a cependant été montré que des hétérodimères peuvent se former entre VEGF-A et PlGF mais aussi entre VEGF-A et VEGF-

B (Cao et al. 1996). En plus de ces six membres, des phénomènes d'épissage alternatif viennent agrandir la complexité de ce système (Koch and Claesson-Welsh 2012).

Le VEGF-A est le plus connu et est produit par de nombreuses cellules telles que les CE, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les plaquettes, les neutrophiles et les macrophages (Barrientos et al. 2008). Il existe sous plusieurs isoformes (VEGF 121, 165, 189 et 206). C'est l'isoforme 165 qui est la forme la plus étudiée pour son activité tant au niveau physiologique que pathologique. Ce facteur joue un rôle prépondérant dans les événements précoces de l'angiogenèse participant à la migration, à la prolifération, et à la perméabilité des cellules endothéliales. La plupart du temps, ce facteur agit de manière paracrine, stimulant les cellules adjacentes. Cependant, dans le cadre de la survie cellulaire, il peut agir de façon autocrine. L'expression du VEGF est notamment contrôlée par l'hypoxie de l'environnement cellulaire. En effet, lorsque l'oxygène vient à manquer, l'HIF est produit et celui-ci peut se fixer sur des régions du promoteur du gène du VEGF et induire une augmentation de leur expression (Koch and Claesson-Welsh 2012).

Le VEGF agit par l'intermédiaire de ses récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) (**Figure 5**). Ils n'ont pas tous la même expression et ne sont pas impliqués dans les mêmes phénomènes. Le VEGFR1 (Flt1) est plutôt exprimé au niveau des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales ; Le VEGFR2 (Flk1/KDR) est exprimé à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Ces deux premiers récepteurs sont impliqués dans la réponse des cellules endothéliales vasculaires au VEGF. Le VEGFR3 (Flt4), quant à lui, est exprimé au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Il régule les fonctions VEGF-dépendantes de ces cellules (Koch and Claesson-Welsh 2012). La structure des récepteurs est relativement similaire bien que leurs fonctions soient différentes. Leur domaine extracellulaire est composé de 7 boucles *immunoglobuline-like* (*Ig-like*). Ils possèdent un simple segment transmembranaire et un domaine intracellulaire présentant un domaine kinasique, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ATP.

Le mécanisme d'activation des récepteurs et des voies de signalisation associées est sensiblement le même pour les 3 récepteurs. Le ligand vient se fixer sur le domaine extracellulaire du récepteur permettant l'homodimérisation de celui-ci. Cette dimérisation est possible grâce à la fixation du ligand sur les domaines *Ig-like* 2 et 3 alors que les dimères sont stabilisés par l'interaction des deux récepteurs via les domaines *Ig-like* 4 et 7. Suite à ces interactions, des changements de conformations au sein du domaine intracellulaire surviennent, ce qui permet d'exposer le site de liaison à l'ATP et d'engendrer différentes phosphorylations sur des résidus tyrosines (auto- et transphosphorylation). Ces sites de phosphorylation constitueront des sites d'accrochages pour les différents adaptateurs et enzymes possédant un domaine SH2 ou PTB. Ceci

permet de transmettre le signal jusqu'à la réponse physiologique (Grunewald et al. 2010, Koch and Claesson-Welsh 2012).

Ce schéma de signalisation est cependant plus complexe car des co-récepteurs peuvent intervenir et moduler la transduction du signal (Grunewald et al. 2010). C'est le cas notamment de NRP-1 (*Neuropilin-1*) qui est impliqué dans le *trafficking* et du protéoglycan héparane sulfate qui permet la concentration et la capture du VEGF circulant au sein de la matrice extracellulaire. Les intégrines jouent également un rôle prépondérant dans la transduction du signal (Grunewald et al. 2010).

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes concentrés sur l'étude du VEGFR2 car il est impliqué dans toutes les étapes de l'angiogenèse. C'est pour cette raison que le point suivant consistera à détailler son mode de fonctionnement.

### 3.1.1. Le VEGFR2

Le VEGFR2 est un récepteur de 200-230 kDa liant le VEGF-A, -C, -D et -E. Il joue un rôle essentiel dans l'angiogenèse au cours du développement mais également à l'âge adulte. Il est particulièrement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et leurs progéniteurs. L'activation de ce récepteur et des voies qu'il contrôle mène à l'augmentation de la prolifération, de la migration et de la perméabilité cellulaires mais aussi au maintien de la survie cellulaire (**Figure 6**). Les sites principaux de phosphorylation sont les suivants : Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214 et se situent au niveau du domaine intracellulaire. Le site Y1175 semble être le site le plus important. En effet, le remplacement de cette tyrosine par une phénylalanine engendre la mort des embryons de souris (Sakurai et al. 2005). Il existe également d'autres sites de phosphorylation (Y1305, 1309, 1319 et 801) mais leur fonction n'est pas encore bien comprise.

Le site Y1175, une fois phosphorylé par la liaison du VEGF, est un site de liaison pour de nombreux adaptateurs comme la phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Son activation mène à l'hydrolyse de PIP2 (*Phosphatidylinositol biphosphate*) en IP3 et en DAG (Diacylglycérol). L'IP3 (*Inositol triphosphate*) augmente la concentration cytoplasmique en calcium. Ce dernier en combinaison avec le DAG membranaire active la PKC (*Protein Kinase C*) qui, à son tour, active le facteur RAF et s'ensuit la cascade MEK/ERK conduisant à la régulation de certains gènes, et ainsi à l'augmentation de la prolifération (**Figure 6**) (Shibuya and Claesson-Welsh 2006, Koch and Claesson-Welsh 2012). Le VEGFR2 est connu pour activer la voie des ERK et MAPK. Cependant il a été montré qu'il ne le fait pas via la voie classique GRB2-SOS-RAS comme les autres RTK mais par la voie décrite ci-dessus (Takahashi et al. 2001).

Le site pY951 joue un rôle très important dans la liaison et la phosphorylation de TSad (*T cell specific adapter*). Cette protéine possède un domaine PTB et SH2 lui permettant de se lier sur la tyrosine Y951 phosphorylée du VEGFR2. De plus Tsad peut se lier à la kinase Src. Cette voie est impliquée dans la régulation de l'organisation des fibres d'actines. Par conséquent, sous l'effet du VEGF, l'activation du récepteur et de cette voie déclenche la migration cellulaire (**Figure 6**) (Matsumoto et al. 2005). La migration des cellules endothéliales dépendante du VEGF/VEGFR2 peut aussi être activée par l'intermédiaire des voies FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Holmqvist et al. 2004) via la tyrosine 1175 du VEGFR2 et p38 MAPK via la tyrosine 1214 du VEGFR2 (Lamallice et al. 2006).

Le VEGFR2 est également capable d'induire la voie PI3K activant PDK1/2 (*Phosphoinositide Dependent kinase 1/2*) qui active la voie PKD/AKT. Ensuite AKT phosphoryle BAD (*BCL-2 associated promotor*) et la caspase 9, inhibant ainsi leur activité apoptotique. D'après des études de Blanes et de Caron, ce sont les tyrosines 801 et 1214 qui sont impliquées dans l'activation d'AKT (Blanes et al. 2007, Caron et al. 2009). Enfin, une des fonctions très importante du VEGFR2, activé par le VEGF, est l'augmentation de la perméabilité. Celle-ci nécessite la production d'oxyde nitrique par l'oxyde nitrique synthase (eNOS). Elle est activée par la voie de la PLC $\gamma$  ou par la voie AKT (**Figure 6**) (Takahashi and Shibuya 2005, Shibuya and Claesson-Welsh 2006).

### 3.1.2. Le trafficking du VEGFR2

Le *trafficking* du VEGFR2 est un sujet complexe. De nombreuses zones d'ombres subsistent. Il est généralement admis que la liaison du VEGF à son récepteur provoque son internalisation. Ce dernier se retrouve alors au sein des endosomes le conduisant, soit vers les lysosomes pour dégradation, soit vers d'autres endosomes (Rab4 et Rab11) permettant son recyclage à la membrane plasmique. Ce recyclage fait également intervenir la fraction de VEGFR2 nouvellement synthétisée, présente dans le Golgi. Ce voyage à l'intérieur de la cellule n'est pas aussi simple. En effet, de nombreux intermédiaires interviennent pour le réguler.

Le niveau de base de VEGFR2 présent à la surface des cellules est maintenu grâce aux processus d'internalisation, de recyclage, de synthèse, et bien entendu d'adressage à la membrane. Cependant, une grande quantité de ce récepteur est présent au sein des endosomes précoces (Jopling et al. 2014). La stimulation par le VEGF favorise la mobilisation du VEGFR2, présent dans le Golgi et les endosomes, et son transport vers la membrane plasmique. Ce transport est nécessaire pour l'activation et la signalisation du récepteur. Il a été montré qu'une protéine faisant partie de la famille des myosines, Myo1c, ainsi que la syntaxine-6, sont indispensables pour ce transport (Tiwari et al. 2013).



Le VEGFR2 est un récepteur qui est également localisé dans les *caveolae* des CE. La cavéoline-1, composante des *caveolae*, se lie au VEGFR2 et régule son activité. En effet, Labrecque et ses collègues ont montré que la localisation du VEGFR2 dans les *rafts* est nécessaire pour la phosphorylation des ERK et pour la migration des CE. Les *lipid rafts* sont donc des plateformes membranaires nécessaires à la signalisation du VEGF et peuvent jouer de nombreux rôles dans la régulation du VEGFR2 et de l'angiogenèse. Cependant, leurs rôles exacts sont encore controversés et pourraient dépendre de la voie de signalisation étudiée. En effet, la destruction des radeaux lipidiques engendre une inhibition de la voie des ERK et de la migration des CE alors qu'elle conduit à une augmentation de la phosphorylation de la PLC $\gamma$  (Labrecque et al. 2003, Ikeda et al. 2005, Jopling et al. 2014).

La signalisation du VEGFR2 est fortement régulée par sa localisation intracellulaire. A la surface, le VEGFR2 activé est rapidement déphosphorylé et inactivé par de nombreuses phosphatases. A côté de ceci, l'internalisation du VEGFR2, tout comme celle d'EGFR ou des récepteurs du TGF- $\beta$ , permet sa signalisation au sein des compartiments endosomaux. Cette internalisation est principalement dépendante de la clathrine et indispensable pour la signalisation du VEGFR2. En effet, un traitement des cellules avec de la dynasore, drogue inhibitrice des voies endocytiques, réduit le niveau de phosphorylation du VEGFR2 activé par le VEGF (Sawamiphak et al. 2010). Une fois à l'intérieur de la cellule, les vésicules d'endocytose conduisent le récepteur au sein des endosomes précoces (caractérisé par la présence du marqueur EEA-1 (*Early Endosomal Antigen-1*)). Lanahan et al. ont découvert que le *trafficking* du VEGFR2 vers les endosomes précoces nécessite l'intervention du complexe synectine-myosine-6. Un élément perturbant ce transport engendre une déphosphorylation d'Y1175. En effet, les vésicules d'endocytose sont alors localisées pour une période plus longue dans l'espace sous-membranaire exposant ainsi les tyrosines du VEGFR2 à de nombreuses phosphatases telles que PTP1b (*Protein Tyrosine Phosphatase 1b*) (Lanahan et al. 2010). Ceci diminue sa signalisation. Par conséquent, la localisation au sein des endosomes précoces protège le récepteur des événements de déphosphorylation. Elle est donc essentielle au VEGFR2 pour certaines de ses fonctions comme l'activation de la voie des ERK (Lampugnani et al. 2006).

Enfin, après le passage dans les endosomes précoces, le VEGFR2 est adressé dans divers autres compartiments. D'une part, la signalisation peut être stoppée par adressage aux endosomes tardifs (Rab7) et puis aux lysosomes. Ceci conduit à la dégradation du récepteur. A côté de ce premier destin, le VEGFR2 peut être conduit des endosomes précoces aux endosomes de recyclage (Rab4 et Rab11). De nombreuses phosphatases y déphosphorylent les diverses tyrosines du récepteur. Cette voie est favorisée par la stimulation par le VEGF et permet d'amener le VEGFR2 inactif à la surface de la cellule (Gampel et al. 2006, Lanahan et al. 2010).

### 3.2. La famille du FGF

La famille du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) est sensiblement plus grande que celle du VEGF. Il y aurait entre 18 et 22 gènes (Gerwins et al. 2000, Turner and Grose 2010) impliqués dans la production de 23 facteurs (Kelleher et al. 2013). La signalisation par le FGF est impliquée dans le développement de nombreux organes et est toujours fortement présente chez l'adulte, notamment dans les processus de régulation de l'angiogenèse et de cicatrisation (Turner and Grose 2010). De plus, le FGF est très important dans l'homéostasie du glucose, du phosphate, du cholestérol et de la vitamine D (Kelleher et al. 2013). Le FGF est une glycoprotéine sécrétée qui est généralement séquestrée dans la matrice extracellulaire grâce à sa liaison aux protéoglycanes de type héparane sulfate (HPSG). Cette liaison à l'héparine permet de protéger le FGF de la dégradation par des protéases et génère un réservoir localisé de FGF. La signalisation du FGF passe par sa libération de la matrice extracellulaire via des héparinases. Le FGF libéré peut alors se fixer sur le HPSG de la surface cellulaire. Ceci permet d'initier la formation d'un tricomplexe avec le récepteur membranaire, le FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptors*) (Turner and Grose 2010). En effet, les HSPG ont la capacité de se fixer à la fois sur le FGF et sur son récepteur. La présence de l'héparine permet d'augmenter l'affinité entre le FGF et son récepteur, ainsi que le temps de demi vie du complexe, permettant alors sa signalisation (Ornitz and Itoh 2001).

Parmi tous les membres de cette famille, ce sont les FGF1 (*acidic FGF*) et 2 (*basic FGF*) qui sont les plus étudiés dans le cadre de l'angiogenèse (Presta et al. 2005). Ces deux protéines sont exprimées par de nombreux types cellulaires et notamment par les cellules endothéliales (Turner and Grose 2010). Il existe cependant peu d'études concernant le rôle du bFGF (*basic FGF*) dans les CE.

#### 3.2.1. Les récepteurs FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptors*)

Le facteur FGF est capable de lier quatre récepteurs différents, les FGFR 1, 2, 3, et 4. De plus, des phénomènes d'épissage alternatif permettent d'augmenter la diversité au sein de chaque classe de récepteurs. Ils font partie de la famille des RTK (*Receptor Tyrosin Kinase*). Ils présentent un domaine extracellulaire composé de trois domaines *Ig-like* et un domaine intracellulaire présentant des sites tyrosines kinases (**Figure 7**). Un cinquième récepteur existe (FGFR5). Cependant, il est dépourvu de domaine tyrosine kinase et pourrait avoir un rôle dans la régulation négative du signal (Wiedemann and Trueb 2000).

La liaison du ligand au récepteur implique également l'héparane sulfate ou l'héparine afin de former un complexe ternaire. Cette liaison engendre une dimérisation du récepteur et un changement de conformation aboutissant à des phénomènes d'autophosphorylation sur diverses tyrosines. Comme pour le VEGFR, ces sites phosphorylés servent de domaines de fixation pour

différentes molécules impliquées dans la transduction du signal. Parmi les différentes voies de signalisation possibles, la protéine nommée FRS2 (*FGFR Subtrat 2*) joue le rôle d'adaptateur clé. Il se fixe au niveau du domaine juxtamembranaire grâce à son domaine PTB. Le FGFR activé peut phosphoryler cette protéine et permet alors le recrutement de SOS (*Son Of Sevenless*) et de GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound 2*). Ces protéines mènent à l'activation de la voie RAS/RAF/MAPK. GRB2 peut également mener à l'activation de la voie AKT via GAB1 (*GRB2-Associated Binding protein 1*) et PI3K (**Figure 8**). La liaison du FGF à son récepteur permet également l'activation de la voie MAPK via la protéine adaptatrice PLCγ (**Figure 8**), mais aussi d'autres voies moins étudiées (Turner and Grose 2010, Katoh and Nakagama 2014).

Les cellules endothéliales expriment beaucoup de FGFR1 et peu de FGFR2, tous deux impliqués dans l'angiogenèse. Les FGF 1, 2, et dans une moindre mesure, les 4 et 8, sont capables d'initier la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales et de leurs précurseurs mais aussi la dégradation de la matrice extracellulaire. Le bFGF (FGF2) peut également moduler l'expression des intégrines (Presta et al. 2005). La voie MAPK est une voie prépondérante dans les différentes réponses aux FGF. Cependant, les autres voies mentionnées ci-dessus peuvent aussi être impliquées. Par exemple, la voie impliquant la PKC est importante pour la prolifération et la migration dépendante du bFGF (Presta et al. 1991, Turner and Grose 2010, Monti et al. 2013). La voie faisant intervenir FGF/FGFR1 et la PI3K permet également de déclencher la motilité des cellules endothéliales. En effet, l'utilisation de la *wortmannin*, un agent bloquant la voie PI3K, inhibe la migration des CE (Landgren et al. 1998).

La voie du FGF est fortement liée à celle du VEGF. En effet, ces deux voies agissent en synergie pour promouvoir la néovascularisation. Le FGF2 est capable d'augmenter l'expression des VEGFR et du VEGF dans les cellules endothéliales. Le VEGF peut, lui aussi, augmenter l'expression du FGF2. La présence du VEGF et du bFGF (FGF2) dans une tumeur engendre une croissance très rapide et une haute densité de vaisseaux sanguins est observée au sein de cette dernière (Saylor et al. 2012).

La famille du FGF est fortement impliquée dans la tumorigenèse. Le FGF présent dans la matrice extracellulaire peut être libéré et dès lors disponible pour stimuler l'angiogenèse au sein de la tumeur. Un phénomène particulier découvert récemment est l'implication des complexes FGF/FGFR dans les phénomènes de résistance face aux traitements anti-VEGF et anti-VEGFR dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse. Certains patients soumis à une thérapie anti-VEGF présentent toujours une néovascularisation tumorale. Chez ces patients, il a été montré que la régulation de la signalisation du FGF est altérée. Ceci permet de compenser la diminution de la signalisation du VEGF (Saylor et al. 2012). Il existe donc un *crosstalk* entre les voies du VEGF et du FGF.

### 3.2.2. *Le trafficking du FGFR*

Suite à l'activation du FGFR, celui-ci peut être internalisé au sein des endosomes précoces pour, d'une part, être recyclé ou, d'autre part, être dégradé par l'intermédiaire des endosomes tardifs et des lysosomes. Les connaissances sur l'internalisation des récepteurs FGFR sont relativement minces. Il est généralement admis que la fonction première de son internalisation est l'atténuation du signal de départ (Turner and Grose 2010, Nadratowska-Wesolowska et al. 2013). Cette atténuation peut impliquer la phosphorylation de différentes sérines, à la fois sur le récepteur lui-même ou sur des protéines y étant associées, comme FRS2. Ces sérines phosphorylées servent de sites d'accrochage à des phosphatases telles que MKP3 (*MAPK Phosphatase 3*). Celles-ci sont capables de venir déphosphoryler diverses protéines et d'atténuer la signalisation. Des phénomènes d'ubiquitination peuvent également mener à l'atténuation du signal. Cette atténuation est alors due à la dégradation des complexes. Ceci a notamment été montré au niveau des neurones (Persaud et al. 2011). Selon un article récent, ces phénomènes d'atténuation seraient régulés par la présence de co-récepteurs. Il a notamment été montré que la sérine/thréonine kinase RSK2 est capable de réguler négativement la phosphorylation du récepteur afin d'empêcher une activation trop importante. L'inactivation de RSK2 permet alors le prolongement de la signalisation en empêchant son endocytose et sa dégradation (Nadratowska-Wesolowska et al. 2013).

Cependant, une autre hypothèse est apparue, selon laquelle cette internalisation permet aussi de renforcer le signal émis par les complexes (Irschick et al. 2013). Cette étude a été réalisée sur des cellules neuronales et affirme que la voie de recyclage du récepteur permettrait de maintenir sa signalisation sur un plus long terme. Les Rab des endosomes y jouant un rôle important.

Récemment, il a été montré que les cellules endothéliales provenant de souris déficientes en cavéoline-1 sont sujettes à une prolifération incontrôlée (Drab et al. 2001). Ce résultat laisse à penser que la cavéoline et donc les *caveolae* sont impliquées dans l'angiogenèse. L'implication de ces microdomaines membranaires est bien connue pour la famille VEGF/VEGFR. Néanmoins, très peu d'études mentionnent leur implication dans la signalisation FGF/FGFR. Une étude récente a mis en évidence la localisation de FGFR1 et de ses intermédiaires de signalisation (ERK1/2 et AKT1) dans ces microdomaines membranaires. De plus, ils ont observé que la destruction des ceux-ci engendre une perte de la signalisation des voies MAPK et PI3K. Ces voies mènent aux processus de prolifération, de migration et de formation de tubes induits par la stimulation au bFGF (Feng et al. 2012). Ces domaines membranaires semblent donc fonctionner comme des plateformes capables d'organiser l'angiogenèse induite par le FGF2. Ce mémoire tentera

d'apporter de plus amples informations concernant l'implication des *lipid rafts* dans la signalisation du bFGF

### 3.3. La famille de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*)

Cette troisième famille de récepteurs de facteurs de croissance est largement étudiée. Elle compte quatre récepteurs de type RTK et 13 ligands polypeptidiques parmi lesquels on retrouve l'EGF, le TGF- $\alpha$ , l'HBEGF, l'amphiréguline, la bétacelluline, l'épiréguline, l'épigène,...(Citri and Yarden 2006, Schneider and Wolf 2008). La structure des récepteurs est relativement conservée avec un segment extracellulaire composé de 4 domaines, une unique hélice transmembranaire et un domaine cytoplasmique contenant le domaine tyrosine kinase. Les 4 récepteurs sont nommés ErbB1/EGFR (*Epidermal Growth factor Receptor*), ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. Une particularité de ces récepteurs est que seuls EGFR et ErbB4 possèdent une structure complète. En effet, ils présentent un domaine de liaison et un domaine kinase fonctionnels. ErbB2, quant à lui, est incapable de lier un ligand alors qu'ErbB3 possède un domaine cytoplasmique dépourvu d'activité kinasique (Normanno et al. 2006). La stimulation de ces récepteurs, par leurs ligands, permet de générer des homodimères mais également des hétérodimères. Ceci est indispensable pour moduler les différentes voies de signalisation initiées. De plus, il a été montré qu'ErbB2, lié à un autre récepteur, agit comme un élément stabilisateur mais aussi comme un amplificateur du signal (Pinkas-Kramarski et al. 1996).

Les ligands de ces récepteurs sont variés mais partagent tous la présence de un ou plusieurs domaines EGF. Ce domaine EGF est une séquence de 40-60 acides aminés contenant six cystéines responsables de la formation de trois ponts disulfures. Il est responsable de l'interaction avec le récepteur (Schneider and Wolf 2008).

La liaison d'un ligand sur un récepteur ErbB se fait au niveau des domaines extracellulaires I et III (**Figure 9**) et conduit à la dimérisation du récepteur ou à une stabilisation d'un dimère préexistant. Cette dimérisation peut être une homo- ou une hétérodimérisation. Ces interactions s'effectuent grâce à la liaison des domaines II et IV. Walker et al. expliquent que la liaison d'un ligand sur un récepteur ErbB contribue d'une part à augmenter la quantité de dimères présents à la surface de la cellule mais joue également un rôle dans la stabilisation des dimères formés. La liaison du ligand, suivie de l'interaction des récepteurs entre eux, engendre un changement de conformation au sein de ces derniers. Ceci leur permet de passer d'une forme inactive à une forme active. Cette activation conduit à des phénomènes d'auto- et de transphosphorylation au niveau de résidus tyrosines qui servent alors de site d'accrochage pour les nombreux signaux intermédiaires des voies de signalisation (Walker et al. 2004, Warren and Landgraf 2006).

Les voies de signalisation induites par ces récepteurs sont diverses et diffèrent d'un récepteur à l'autre. En effet, EGFR est capable d'activer la voie des MAPK (Kohsaka et al. 2014) mais est incapable d'activer directement celle de la PI3K alors qu'ErbB3, par l'intermédiaire de sa dimérisation avec ErbB2, est capable d'activer cette voie (Wallasch et al. 1995). Parmi toutes les voies activées par les quatre récepteurs, il y a la voie des MAP kinases, la voie de la PLC $\gamma$ , la voie AKT via PI3K et la voie des STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Les réponses cellulaires faisant suite à ces voies de signalisation, déclenchées par les récepteurs ErbB, sont nombreuses et comprennent la prolifération, la différenciation, l'inhibition de la croissance cellulaire, la médiation de l'apoptose, etc.

ErbB1, également appelé EGFR, est un des récepteurs les plus importants. En effet, les souris *knockout* pour ce récepteur sont létales. Contrairement à ce phénotype, les souris mutantes en un des ligands d'EGFR ne sont pas létales. En effet, les souris *knockout* pour l'EGF ou encore pour l'amphiréguline ne présentent pas de phénotype particulier. En ce qui concerne TGF- $\beta$ , seules de légères anomalies au niveau des yeux et un problème au niveau des follicules pileux sont observés. Ces différentes études montrent une certaine redondance entre les ligands (Threadgill et al. 1995, Citri and Yarden 2006).

### 3.3.1. EGFR (*Epidermal Growth Factor receptor*)

EGFR également nommé ErbB1 est une glycoprotéine transmembranaire de 170kDa capable de fixer différents ligands tels qu'EGF, TGF- $\alpha$  mais aussi l'amphiréguline. En condition physiologique, il est surtout impliqué dans le développement épithélial de différents organes en contrôlant à la fois la prolifération, la migration ou encore la différenciation des cellules (Citri and Yarden 2006). En condition pathologique, ce récepteur est impliqué dans de nombreux cancers où il agit en augmentant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses ou métastatiques (Normanno et al. 2006). EGFR est donc une cible intéressante pour le développement des traitements anti-cancéreux.

La liaison du ligand à l'EGFR induit l'homodimérisation du récepteur mais également son hétérodimérisation avec ErbB2, 3 ou 4, et conduit ainsi à l'activation de plusieurs voies cellulaires (**Figure 10**). De nombreuses tyrosines sont phosphorylées au sein du site cytoplasmique et celles-ci permettent le recrutement de GRB2 et Shc qui sont alors responsables du recrutement de Ras et de l'activation de la voie MAPK. L'EGFR phosphorylé peut également activer directement la voie des STAT, une famille de facteurs de transcription. Par contre, il active indirectement la voie PI3K/Akt/PKB car il ne possède pas de site d'interaction avec la PLC $\gamma$ . Cependant il peut l'activer par l'intermédiaire de la voie Ras ou par la formation de l'hétérodimère EGFR/ERbB3 (Citri and Yarden 2006).

L'EGFR est situé au niveau de domaines particuliers de la membrane plasmique, les *lipid rafts*. La liaison du ligand provoque le départ du complexe hors de ces structures membranaires et conduit alors à son internalisation. L'internalisation peut être dépendante ou indépendante de la clathrine. Dans le cas de l'internalisation dépendante de la clathrine, les récepteurs se retrouvent d'abord dans des petites vésicules proches de la membrane plasmique avant d'être dirigé au sein des endosomes précoces. Ces endosomes fusionnent pour donner les corps multivésiculaires ou les endosomes tardifs. Certains signaux tels que la liaison du facteur Cbl sur la queue C-terminale d'EGFR, conduit à sa dégradation par l'intermédiaire des lysosomes. A côté de ceci, l'EGFR peut être recyclé à la membrane (Sorkin and Goh 2009). Tous ces événements sont considérés comme des boucles négatives afin d'atténuer le signal généré par EGFR. Cependant, il existe également des boucles positives renforçant le signal. En effet, la liaison d'ErbB2 avec l'EGFR peut augmenter la durée du signal en empêchant son endocytose (Citri and Yarden 2006). De plus, l'EGFR est capable de poursuivre sa signalisation au sein des endosomes (Wang et al. 2002).

### 3.3.2. *EGFR et cancer :*

Le développement tumoral dépend, dans de nombreux cas, de la surexpression de récepteurs tyrosines kinase (RTK) tels qu'EGFR. Dans de nombreuses tumeurs solides, ce récepteur présente une activité anormalement élevée. Généralement, ceci est associé avec un mauvais pronostic. Les mécanismes par lesquels sont activés ces récepteurs sont multiples. Premièrement, les cellules tumorales et les cellules stromales de l'environnement tumoral produisent une grande quantité de ligands. Deuxièmement, ces mêmes cellules peuvent exprimer le récepteur EGFR muté possédant une sensibilité plus importante vis-à-vis de son ligand. Enfin, des mutations peuvent conduire à l'expression d'ErbB1 constitutivement actif. La présence de ces récepteurs mutés et la production de leurs ligands dans l'environnement tumoral permet à l'EGFR d'initier la transformation tumorale des cellules, ce qui implique une prolifération très importante, participant alors au développement tumoral (van Cruysen et al. 2005).

## 4. *L'uPAR (Urokinase Plasminogen Activator Receptor)*

L'uPAR (*Urokinase Plasminogen Activator Receptor*) est un acteur très important de l'angiogenèse. Il est surtout connu pour participer à la dégradation de la matrice extracellulaire. En effet il fait partie du système plasminogène/plasmine.

### 4.1. **Le système plasminogène/plasmine**

La plasmine est une protéase à sérine active qui a pour rôle la fibrinolyse et la dégradation de divers composés de la matrice extracellulaire soit directement, soit via l'activation de

métalloprotéinases. Elle est d'abord présente dans la matrice extracellulaire (MEC) sous une forme inactive, le plasminogène. Cette forme zymogène doit être clivée en plasmine afin d'être active. Ce clivage est effectué par deux protéases, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA). Le tPA agit dans la circulation, où il est impliqué dans la fibrinolyse. L'uPA est une protéase à sérine active, sécrétée sous une forme inactive (pro-uPA). Cette forme est activée par clivage protéolytique lors de sa liaison à son récepteur, l'uPAR, à la surface cellulaire. L'uPA génère ainsi la plasmine par protéolyse, ce qui conduit à la dégradation de la MEC et, à la libération de divers facteurs de croissance (bFGF, VEGF ou encore TGF- $\beta$ ) séquestrés dans la MEC. De cette manière, le complexe uPA/uPAR participe activement à la migration de nombreux types cellulaires, notamment des CE ; événement indispensable au cours de l'angiogenèse (Blasi and Carmeliet 2002, Alfano et al. 2005). L'activation du plasminogène est hautement régulée, notamment par l'inhibition directe des activateurs tPA et uPA, via PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*).

#### 4.2. L'uPA

L'uPA est une protéase à sérine active sécrétée sous la forme d'un zymogène simple chaîne de 411 acides aminés. Cette protéine est produite par les cellules endothéliales, les SMC, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, et aussi par les cellules tumorales de différentes origines (Fuhrman 2012). La structure de cette enzyme comprend deux régions : le domaine N-terminal (ATF) contenant le domaine de type *EGF-like* et le domaine Kringle (interactions protéine-protéine) et enfin le domaine catalytique en C-terminal. Un premier clivage, via la plasmine et d'autres protéases, mène à son activation. Un second clivage libère le domaine ATF laissant le domaine C-terminal seul mais toujours actif. La liaison du pro-uPA à son récepteur uPAR est indispensable à l'activation en uPA (Blasi and Carmeliet 2002). En plus de ces fonctions protéolytiques, l'uPA liée à son récepteur peut moduler différentes voies de signalisation menant à la migration, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires (Alfano et al. 2005).

#### 4.3. L'uPAR

L'uPAR, (ou CD68) est une glycoprotéine membranaire composée de 288 acides aminés après maturation. Elle est attachée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et comporte trois domaines homologues (DI, DII et DIII) (Blasi and Sidenius 2010). Cette protéine est exprimée à la surface de nombreuses cellules de l'organisme. Dans les organismes sains, il est exprimé de manière modérée au niveau des poumons, du cœur, de la vessie, du foie, des testicules, de l'utérus ou encore des vaisseaux. Son expression est augmentée dans les tissus à remodelage intensif, comme les trophoblastes dans l'utérus lors de la grossesse, les kératinocytes et les cellules endothéliales lors de la cicatrisation.



(Breuss and Uhrin 2012). De plus, son expression est importante dans diverses pathologies comme le cancer ou les événements inflammatoires (Blasi and Sidenius 2010, Breuss and Uhrin 2012).

Ce récepteur est capable de lier la pro-urokinase (pro-uPA), aussi bien que l'urokinase active (uPA) avec une très haute affinité ( $K_d=1\text{nM}$ ) grâce au domaine de liaison composé de résidus des trois domaines (DI, II et III) de l'uPAR. Le récepteur de l'urokinase est également capable d'interagir avec le domaine N-terminal somatomédine B (SMB) de la vitronectine, une protéine de la matrice. Cette interaction se fait grâce aux domaines DI et DIII et joue un rôle dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaires (Binder et al. 2007)

Le rôle de l'uPAR est double. En effet, il est capable de réguler la protéolyse extracellulaire mais il est également associé à un grand nombre de voies de signalisation cellulaires menant à l'adhésion, la migration, la prolifération mais aussi la différenciation et la survie cellulaires (Blasi and Carmeliet 2002). Etant dépourvu de domaines transmembranaire et cytoplasmique, il s'associe à divers co-récepteurs (RTK, intégrines, LRP) (**Figure 11**) afin d'initier ses différentes voies (MAPK, PI3K-Akt, FAK, NF- $\kappa$ B et Jak/Stat). Il a notamment été montré que l'uPAR est capable de réguler diverses fonctions des cellules tumorales par la formation de complexes membranaires avec l'EGFR et les intégrines (Liu et al. 2002, Liu et al. 2009).

#### 4.3.1. Le trafficking de l'uPAR

L'uPAR, attaché à la membrane par un lien GPI, est localisé de manière abondante dans les *lipid rafts*. En 2010, Raghu a montré que la désorganisation des *rafts* par la cyclodextrine inhibe la migration, l'invasion et l'angiogenèse (dépendante de l'uPAR) des cellules de cancer du sein. Les *lipid rafts* sont donc des microdomaines essentiels à la signalisation et aux fonctions du récepteur de l'urokinase (Raghu et al. 2010).

La liaison de l'uPA à son récepteur, suivie de la formation du complexe ternaire avec PAI-1 et une protéine membranaire faisant partie de la famille des récepteurs LDL (*Low-Density-Lipoprotein*), LRP-1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*). Cette internalisation peut mener à la dégradation de l'uPAR par les lysosomes ou encore à son recyclage. Ce recyclage est impliqué dans les phénomènes de migration cellulaire. En effet, durant la migration des cellules, l'uPAR est dirigé vers les plaques d'adhésions focales le long du front de migration. Ceci est possible soit par des mouvements latéraux membranaires de l'uPAR soit, par son internalisation et son recyclage (Binder et al. 2007, Liu et al. 2009).

#### 4.3.2. L'uPAR et l'angiogenèse

L'uPAR est également capable de réguler l'angiogenèse où il y joue un rôle essentiel. En effet, il a été montré que les cellules endothéliales provenant de souris *knockout* pour le gène de l'uPAR présentent seulement une faible activation de l'angiogenèse. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont permis de confirmer cette importance. En effet, l'absence d'uPAR altère la migration, l'adhésion, la prolifération et la tubulogenèse des cellules endothéliales (Balsara et al. 2011). En 2004, Prager et son équipe ont montré que la migration des CE induite par le VEGF nécessite d'une part l'internalisation de l'uPAR et, d'autre part, sa redistribution à la surface migratoire de la cellule. De plus, cette invasion cellulaire est dépendante des intégrines  $\beta 1$  et de la formation du complexe uPA/uPAR. Le VEGF induit un changement de conformation des intégrines  $\beta 1$  à la surface cellulaire. Ce changement est dépendant de l'activation de la voie PI3K et déclenche l'activation des pro-MMP2 associées aux intégrines. Ces dernières permettent le clivage du pro-uPA, lié à l'uPAR, en uPA. A son tour, l'urokinase permet la dégradation de la matrice extracellulaire et donc l'invasion cellulaire (Prager et al. 2004). De plus, il a été montré que l'internalisation de l'uPAR induite par le VEGF nécessite la formation du complexe uPA/uPAR/PAI-1 et son interaction avec LRP-1. Cette internalisation permet le recyclage de l'uPAR au niveau des adhésions focales, favorisant dès lors la migration cellulaire. L'activation du pro-uPA en uPA est également nécessaire pour ce processus d'internalisation (Prager et al. 2004). Enfin, plus récemment, il a été démontré qu'à côté du VEGF, d'autres facteurs pro-angiogènes comme le bFGF ou l'EGF sont capables d'induire la migration des cellules endothéliales (*in vitro* et *in vivo*) en favorisant l'internalisation et le recyclage de l'uPAR de la même manière que le VEGF. Par conséquent, uPAR est un régulateur central de la migration et de l'invasion des CE (Poettler et al. 2012).

Le complexe uPA/uPAR est donc essentiel pour l'angiogenèse physiologique et tumorale. En effet, il a été montré que l'inhibition de ce complexe prévient la formation des structures en tube des cellules endothéliales lors de tests angiogènes *in vitro*. De plus, la diminution de la quantité d'uPA/uPAR au sein des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses de type glioblastome inhibe leur prolifération. Par conséquent, l'uPAR joue un rôle important dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales et, régule l'angiogenèse (Raghu et al. 2010).

## II. Matériels et méthodes

### 1. Solutions, tampons et réactifs

#### 1.1. Solutions et tampons

PBS : NaCl 137 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,5 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,4

TBS : Tris HCl 25mM; NaCl 250 mM; KCl 10 mM; pH 7,4

MBS : MES 25mM; NaCl 150mM; pH 6,5

Tampon d'électrophorèse : Tris HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1%

Tampon de chargement : Tris HCl 30 mM; SDS 5 %, glycérol 5 % ; bleu de bromophénol 0,002 %; β-mercaptoethanol 2,5 %; pH 6,8

Tampon de transfert : Tris HCl 24 mM ; glycine 192 mM

Tampon Running: Tris 1,5M; pH 8,8

Tampon Stacking: Tris 0,5M; pH 6,8

Tampon de conjugaison : HEPES 20mM, NaCl 150mM

Solution de déshybridation : glycine 0,2M ; 0,1% Tween 20, pH 2,5.

Solution de lyse RIPA : Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM ; NP-40 1 % désoxycholate de sodium 0.5 % ; EDTA 1 mM, DTT 1 mM + inhibiteurs de phosphatases (phostop, Roche, Mannheim, Allemagne), inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche, Mannheim, Allemagne) et octylglucoside 0,2%

Solution de lyse : HEPES 25 mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 0,5 % ; glycérol 10 % + inhibiteurs de phosphatases (phostop, Roche, Mannheim, Allemagne) et inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche, Mannheim, Allemagne)

HBSP 2X : Glucose 12 mM, NaCl 280 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,5 mM, KCl 10 mM, HEPES 50 mM, pH 7,05

#### 1.2. Anticorps

##### 1.2.1. Anticorps primaires

Rabbit anti-human phospho ERK 1/2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4377

Mouse anti-human uPAR (*R and D system*, Minneapolis, MN, USA), ref. MAB807

Rabbit anti-human uPAR (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 12713

Rabbit anti-human uPAR (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 12863

Rabbit anti-human VEGFR2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 2479

Rabbit anti-human phospho-VEGFR2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 2478

Rabbit anti-human FGFR1 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 9740

Rabbit anti-human EGFR (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4267

Rabbit anti-human pan AKT (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4691

Rabbit anti-human phospho-AKT (Ser 473) (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4060

Rabbit anti-human phospho-AKT (Thr 308) (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4056

Rabbit anti-human Rab 4, 5, 7, 11 (*Rab Family Antibody Sampler Kit*, *Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 9385

Mouse anti-human caveoline (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab37141

Rabbit anti-human tubuline (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab6046

Cholera Toxin subunit B couplé à AlexaFluor 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. C34775

Les anticorps primaires sont utilisés à une concentration de 1/1000 en Western blotting et 1/100 en immunofluorescence et en PLA.

### 1.2.2. Anticorps secondaires

Goat anti-rabbit couplé à la HRP (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 7074

Goat anti-mouse couplé à la HRP (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4076

Goat anti-rabbit couplé à Alexa 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11008

Goat anti-rabbit couplé à Alexa 568 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11011

Goat anti-mouse couplé à Alexa 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11001

Goat anti-mouse couplé à Alexa 568 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11004

## 1.3. Réactifs

VEGF-A<sub>165</sub> (*Reliatech*, Wolfenbüttel, Allemagne)

bFGF (*Promega*, Fitchburg, WI, USA)

EGF (*Reliatech*, Wolfenbüttel, Allemagne)

Dynasore (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA)

Cyclodextrine (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA)

BS3 (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA)

DSP (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA)

DTSSP (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA)

## 2. Culture cellulaire

Les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sont extraites de cordons ombilicaux humains et cultivées dans un milieu composé de 75% de milieu sans sérum SFM (*Human endothelial Serum Free Medium + L-glutamine*, *Invitrogen*, *Gibco*, Carlsbad, Californie,

USA) et de 25% d'EGM2 (EBM2 (*Cambrex Bio Science*, Walkersville, USA) + kit EGM 2 SingleQuots, *Cambrex Bio Science*, Walkersville, USA). Afin d'obtenir le milieu complet nécessaire aux cellules HUVEC, 5% de sérum FCS (*Fœtal Calf Serum*) décomplémenté sont ajoutés. Ce milieu complet est renouvelé tous les deux jours. Les HUVEC sont cultivées sur des surfaces préalablement coatées à la gélatine 0,2% (*Merck*, Whitehouse Station, NJ, USA). Ces cellules sont utilisées entre les passages 7 et 10 pour les différentes expériences.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont détachées par une incubation de 3 minutes à 37°C avec 1,5 ml de trypsine-EDTA 0,5% (*Difco*, Detroit, MI, USA) ; EDTA 0,2% ; PBS ; pH 7,6). Elles sont ensuite récupérées dans 10 ml d'EGM-2 et centrifugées 5 minutes à 1000 rpm. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu frais. La suspension est alors répartie dans de nouvelles boîtes (*CELLSTAR*, *Greiner*, Frieckenhausen, Allemagne) contenant du milieu complet. Les boîtes sont incubées à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>.

### 3. Transfection des cellules

Les transfections ont été réalisées par la technique du phosphate calcique : l'ajout d'une solution de chlorure de calcium contenant le siARN à transfecter à une solution saline tamponnée avec de l'HEPES forme un précipité contenant l'ARN à sa surface. Cette suspension est mise en présence des cellules endothéliales adhérentes et le précipité entre dans les cellules par endocytose. Les ions calcium neutralisent les charges négatives de l'ARN, ce qui lui permet de pénétrer dans la cellule.

Les cellules HUVEC sont semées à raison de 180 000 cellules par puits dans 2 ml de milieu sans sérum SFM contenant 5 ng/ml de bFGF dans des plaques 6 puits (*CELLSTAR*, *Greiner*, Frieckenhausen, Allemagne). Le lendemain, 1 heure avant la transfection, le milieu est remplacé par 2 ml de milieu à moitié complet (50% EBM2, 50% EGM-2). Les différentes solutions utilisées pour la transfection sont filtrées à l'aide de filtres de 0,2 µm (*Millex HV*, *Millipore*, Billerica, MA, USA). Un mélange composé de 70 µl d'H<sub>2</sub>O, de 8 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5M et de 2 µl de siARN (50 µM) est mis en présence de 80 µl d'HBSP 2X pendant 1 minute 30 sec avant d'être ajouté goutte à goutte aux cellules. La concentration finale en siARN est 50 nM. Après 16 heures de transfection, les cellules sont trypsinisées et semées dans les supports adéquats aux différents tests.

Types siARN	Séquence
<b>siARN uPAR</b>	5'GGUGAAGAAGGGCGUCCAA3'
<b>siARN contrôle (uPAR)</b>	5'AACCUGCGGGAAGAAGUGG3'

## 4. Tests fonctionnels

### 4.1. Test de prolifération BrdU

Cette méthode de quantification de la prolifération cellulaire est basée sur la mesure de la quantité de 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU), analogue de la thymine, incorporée au sein de l'ADN néosynthétisé. Cette quantification est effectuée grâce au kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU Colorimetric* (Roche, Mannheim, Allemagne).

Les cellules sont semées dans des puits de plaques 96 puits (*CELLSTAR, Greiner, Frieckenhausen*, Allemagne) à raison de 10 000 cellules par puits dans 200 µl de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. Après 48 heures, les cellules sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 30 ng/ml d'EGF dans 100 µl de SFM. Six heures après, les cellules sont mises en présence de 10 µM de BrdU (dilué 100x). Après 24 heures de stimulation, le milieu de culture est éliminé, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé en ajoutant 200 µl de *Fix Denat* pendant 30 minutes à température ambiante. La dénaturation de l'ADN est nécessaire afin de rendre le BrdU accessible aux anticorps. Les cellules sont ensuite incubées 90 minutes à température ambiante en présence de 100 µl d'anticorps anti-BrdU. Elles sont alors lavées trois fois dans 200 µl de tampon de lavage, puis incubées avec 100 µl de substrat pendant 5 à 30 minutes à température ambiante. La plaque est lue au luminomètre/fluorimètre (Wallace Victor 1420 Multilabel counter) à 370 nm. Les valeurs d'absorbance obtenues sont proportionnelles à la quantité d'ADN synthétisé et, par conséquent, au nombre de cellules qui ont proliféré.

### 4.2. Test de prolifération WST-1

Cette méthode permet la quantification de la survie cellulaire. Elle est basée sur la mesure de la quantité de sel de tétrazolium clivé en formazan par les enzymes cellulaires. Cette quantification est effectuée grâce au kit *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche, Mannheim, Allemagne).

Les cellules sont semées dans des puits de plaques 96 puits (*CELLSTAR, Greiner, Frieckenhausen*, Allemagne) à raison de 10 000 cellules par puits dans 200 µl de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. Après 48 heures, les cellules sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 30 ng/ml d'EGF dans 100 µl de SFM. 24 heures après, 10 µl de réactif WST-1 sont ajoutés à chaque puits contenant des cellules. Après 4 heures, la plaque est lue au luminomètre/fluorimètre (Wallace Victor 1420 Multilabel counter) à 420-480 nm.

### 4.3. Test de migration

Les cellules HUVEC sont semées au nombre de 80 000 dans des plaques 48 puits (*CELLSTAR, Greiner, Frickenhhausen, Allemagne*) dans 500 µl de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. A l'arrière de la boîte, sur la face extérieure, quatre traits équidistants et parallèles sont tracés et serviront de repère lors de la mesure du *scratch*. Après 48 heures, une cicatrice est réalisée dans le tapis cellulaire perpendiculairement aux traits repères. Les cellules sont lavées au PBS 1X et sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 30 ng/ml d'EGF dans 250 µl de SFM. La largeur de la cicatrice est alors mesurée aux différents temps souhaités grâce à un objectif gradué.

## 5. Immunohistochimie

Les cellules sont semées dans des puits d'une plaque 6 puits contenant des *coverslips* (*Microscope cover glasses, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) lavés à l'acide et coatés à la gélatine, à raison de 180 000 cellules par puits dans 2 ml de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. Après 48 heures, elles subissent des traitements avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20ng/ml de bFGF et 30ng/ml d'EGF pendant 5 minutes. L'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Elles sont alors rincées au PBS 1X et fixées dans 2 ml de paraformaldéhyde 1% pendant 30 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont bloquées pendant 20 minutes dans une solution de PBS 1X ; BSA 5%. Lorsque l'on veut marquer des structures intracellulaires comme les endosomes, cette solution est additionnée de saponine 0,5%. La saponine est un détergent doux qui perméabilise la membrane cellulaire afin de permettre le marquage des compartiments intracellulaires sans les détruire. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire ou avec deux anticorps primaires lorsque l'on veut étudier la colocalisation de deux protéines, dilués dans une solution de PBS 1X ; BSA 0,5% qui contient également le DAPI (1/500). Le DAPI (*4',6'-diamidino-2-phénylindole*) est une molécule fluorescente qui se lie spécifiquement à l'ADN. Après trois lavages de 5 minutes au PBS 1X, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante, à l'obscurité, avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes. Les cellules subissent à nouveau trois lavages de 5 minutes avec du PBS 1X, suivi d'un dernier lavage avec de l'eau. Les cellules marquées sont ensuite fixées sur lame par 4 µl de prolong (*Prolong gold antifade reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Les marquages sont visualisés avec un microscope confocal (*Leica TCS SP5, Leica-microsystems, Wetzlar, Allemagne*).

## 6. Proximity ligation assay (PLA)

La technologie *duolink* a été élaborée par la firme suédoise *Olink Bioscience* (Uppsala, Sweden) et permet de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines in situ, distantes de moins de 40 nm. Cette méthode est basée sur le principe du *Proximity Ligation Assay* (PLA). Les deux protéines sont reconnues par deux anticorps primaires appartenant à deux espèces différentes. Deux types d'anticorps secondaires conjugués à un oligonucléotide et nommés sondes PLA, plus et minus, se lient à leur anticorps primaire spécifique. Une étape de ligation permet de joindre les deux oligonucléotides qui forment alors un cercle fermé. Ensuite, une des deux sondes PLA sert de *primer* à l'amplification en *rolling circle* dont le cercle d'ADN fermé est la matrice. Des oligonucléotides marqués avec un fluorochrome peuvent alors s'hybrider sur le produit de l'amplification et être révélés au microscope à fluorescence (**figure 12**). Chaque point visualisé correspond à une interaction protéine-protéine. Nous avons utilisé le kit *Duolink® II Fluorescence*.

Les cellules HUVEC sont semées dans des puits d'une plaque 6 puits contenant des *coverslips* (*Microscope cover glasses, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) lavés à l'acide et coâtés à la gélatine à raison de 180 000 cellules/puits dans 2 ml de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. Après 48 heures, elles subissent des traitements avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF et 30 ng/ml d'EGF pendant 5-10 minutes. L'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Elles sont alors rincées au PBS 1X et fixées dans 2 ml de paraformaldéhyde 1% pendant 30 minutes. Les cellules sont traitées avec une solution de blocage pendant 30 minutes à 37°C. Les deux anticorps primaires sont incubés 1h à RT. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois 5 minutes dans une solution de lavage A. Les anticorps secondaires couplés aux sondes PLA sont alors incubés 1 heure à 37°C en présence de DAPI. La solution contenant les anticorps secondaires est éliminée et les cellules sont rincées deux fois 5 minutes avec la solution de lavage A sous légère agitation. Ensuite, les deux sondes PLA sont liguées afin de former un cercle d'ADN fermé grâce à une ligase pendant 30 minutes d'incubation à 37°C. Les échantillons sont rincés deux fois 2 minutes avec la solution de rinçage A. Après cela, le cercle d'ADN fermé subit une étape d'amplification par *rolling circle* durant 100 minutes à 37°C. Les cellules sont alors lavées deux fois 10 minutes dans une solution de lavage B 1X avant un dernier lavage de 1 minute dans la même solution diluée 100 fois. Les *coverslips* sont séchés et fixés sur lame par 4 µl de prolong (*Prolong gold antifade reagent, invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Après 15 minutes, les échantillons peuvent être analysés au microscope à fluorescence (*NIKON eclipse 90i, Tokyo, Japon*).



## 7. Immunoprécipitation

Lorsque les cellules HUVEC arrivent à environ 70% de confluence dans les *dishes* de 140 mm de diamètre (VWR, Radnor, PA, USA), elles sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 30 ng/ml d'EGF dans un volume de 10 ml de SFM pendant 10 minutes. Après cette stimulation, l'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Le milieu de stimulation est éliminé et les cellules sont rincées dans 15 ml de PBS 1X froid. Elles sont alors incubées dans 7 ml d'une solution de *crosslink* contenant 2 mM de DTSSP (*dithiobis succinimidylpropionate*) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) durant 2 heures à 4°C afin de figer la configuration cellulaire. Cette réaction est stoppée dans 15 ml d'une solution de 20 mM de Tris pendant 15 minutes à température ambiante. Après avoir éliminé cette solution, les cellules sont lysées dans 700 µl d'une solution de lyse RIPA pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors grattées et transférées dans des tubes *eppendorf* pour être centrifugées durant 10 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré dans des tubes *eppendorf low retention*.

Pendant les 2h de *crosslink*, les billes magnétiques couplées à la protéine A ou G sont préparées. 50µL de billes sont prélevées dans un tube *eppendorf* et le liquide est retiré à l'aide d'un aimant permettant de précipiter les billes (Cet aimant sera utilisé à chaque étape pour permettre de retirer les solutions des billes). Les billes sont ensuite lavées une fois avec 1 ml d'une solution de PBS 1x-Tween 0,02%. Les anticorps sont ajoutés aux billes (4 à 5 µg) dans 200 µl d'une solution de PBS 1x-Tween 0,02% 10 minutes à RT et sous agitation. Les billes couplées aux anticorps sont lavées une première fois avec 1 ml de PBS 1x-Tween 0,02% et une seconde fois avec 200 µl de tampon de conjugaison. Une fois cette solution retirée, les billes sont incubées 30 minutes à RT avec rotation dans 250 µL de tampon de conjugaison contenant du BS<sub>3</sub> 2 mM. La réaction est stoppée dans du Tris HCl 20 mM pendant 15 minutes à RT avec rotation. Enfin la solution est retirée et 3 lavages sont réalisés avec 1ml de solution de lyse.

Les extraits cellulaires sont alors ajoutés au tube contenant les billes et incubés 10 minutes à RT avec rotation. Ensuite, les billes sont lavées 3 fois avec la solution RIPA et éluées avec 30 µL de tampon de chargement. Enfin un *Western blot* est réalisé.

## 8. Préparation d'extraits protéiques totaux

Les protéines sont extraites à partir des cellules HUVEC semées sur des plaques 6 puits (CELLSTAR, Greiner, Frickenhausen, Allemagne) et traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 15 ng/ml d'EGF. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont alors lysées dans 35 µl de solution de lyse. Le lysat est

transféré dans un tube *ependorf*, puis centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 10 000 rpm (*Sigma, type 1-15, Fisher Bioblock Scientific, Belgique*). Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -20°C.

La concentration en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford à l'aide du *Kit BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)*. La mesure de l'absorbance à 595 nm est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en protéines est évaluée en se rapportant à une droite étalon réalisée à partir de concentrations connues en BSA (*Bovine Serum Albumin*) (*Pierce, Rockford, USA*).

## 9. Western blotting

Les différents extraits protéiques, préalablement dosés, sont séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Pour cela, chaque puits est chargé avec la même quantité de protéines, auparavant dénaturées 5 minutes à 100°C dans du tampon de chargement. La migration s'effectue à 150 Volt dans du tampon d'électrophorèse. Lorsque les protéines sont séparées, elles sont transférées sur une membrane hydrophobe de PVDF (*PolyVinylidène DiFluoride*) (*Immobilon-P, Millipore, Bedford, U.S.A*) à 4°C, pendant 2 heures, à 385 mA, dans un tampon de transfert. La membrane a été préalablement activée par un bain de 30 secondes dans du méthanol, suivi d'un bain de 5 minutes dans de l'eau désionisée, pour terminer par un bain de 5 minutes dans le tampon de transfert.

Lorsque les protéines ont été transférées sur la membrane, celle-ci est saturée pendant une heure à température ambiante dans une solution contenant 8% de poudre de lait diluée dans du TBS 1X-Tween 20 0,1%. La membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS 1X; lait 0,8 % ; Tween 20 0,1% pendant toute la nuit à 4°C avec agitation. Elle est alors lavée trois fois 15 minutes dans une solution de TBS 1 X, Tween 20 0,1%. Elle est ensuite incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans une solution de lait 0,8% ; TBS 1X ; Tween 20 0,1%. Elle subit à nouveau trois lavages de 15 minutes dans du TBS 1X ; Tween 20 0,1% suivis d'un dernier lavage dans du TBS 1X pendant 15 minutes également. La révélation par chémoluminescence est effectuée à l'aide du kit ECL (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA*) ou avec le kit ECL plus (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA*) sur film Fuji medical X-ray (*Fuji, Clichy, France*). En présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la peroxydase (HRP) catalyse la réaction d'oxydation du luminol. Cette réaction émet une chémoluminescence qui sera détectée sur le film photographique.

## 10. Extraction des fractions membranaires

Les cellules HUVEC provenant d'une T75 sont semées dans 2 boîtes de 145 mm diamètre (CELLSTAR, Greiner, Frickenhäusen, Allemagne) dans 20 ml de SFM contenant 5 ng/ml de bFGF. Après 48h, le milieu est retiré et les cellules sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A<sub>165</sub>, 20 ng/ml de bFGF ou 30 ng/ml d'EGF dans 10 ml de SFM pendant 5 minutes. L'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Elles sont alors rincées au PBS 1X. Dans chacune des boîtes, 4 ml de PBS 1x sont ajoutés et les cellules sont grattées avec douceur et récupérées dans un tube FALCON (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) de 15 ml. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 minutes à 1200 rpm et le surnageant est éliminé. Le culot de cellules est resuspendu dans 2ml de carbonate de sodium 500 mM pH 11 avec inhibiteur de protéases (1 pastille Roche pour 10ml de solution). Les cellules resuspendues sont transférées dans un *ependorf* de 2 mL. La solution est ensuite passée 20 fois dans une seringue 26G (*Hypodermic needles 26G, Terumo Neoplus*, Shibuya, TKY, Japon). Les 2 ml sont enfin transférés dans un tube d'ultracentrifugation (*Tube, Thinwall, Polypropylene, 14 mL, 14 x 95 mm, Beckman Coulter*, Fullerton, CA, USA) et 2 ml d'une solution de saccharose 90% (préparée dans une solution de MBS) y sont ajoutés en homogénéisant la solution. Ensuite, un volume de 4 ml d'une solution de saccharose 35% et un volume de 4 ml d'une solution de saccharose 5% sont ajoutés délicatement sans mélanger. Le tube d'ultracentrifugation est équilibré avec un autre tube et l'ultracentrifugation est lancée 16h à 39 000 rpm (*Optima L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter*, Fullerton, CA, USA). Enfin, les différentes fractions sont récupérées et des Western blotting peuvent être réalisés.

## 11. Quantification des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est une technique permettant de quantifier les ARN messagers et de déterminer des régulations géniques. L'expérience est réalisée en deux étapes : la transcription inverse des ARNm totaux et la PCR quantitative en temps réel. La quantification de l'expression d'un gène est basée sur la détection de la quantité de produits générés après chaque cycle de PCR. Cette PCR quantitative est réalisée en présence de SYBR green, un agent intercalant qui émet de la fluorescence lorsqu'il s'intercale dans de l'ADN double-brin. La fluorescence est mesurée après chaque étape d'amplification permettant l'établissement de courbes d'amplification. Ces courbes sont proportionnelles à la quantité d'ARNm initialement présent dans l'échantillon.

### 11.1. Transcription inverse

La transcription des ADNc est réalisée grâce au kit *cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Les échantillons contenant 500 ng d'extraits d'ARN sont mélangés à 4 µL de 5x *iScript reaction mix*, 1 µL d'*iScript reverse transcriptase* ainsi qu'à de l'eau afin d'obtenir un volume final de 20 µL. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Westburg) où il va subir un programme en 3 étapes : d'abord 5 minutes à 25°C, ensuite 30 minutes à 42°C pour effectuer la transcription inverse et, enfin, 5 minutes à 85°C permettant de dénaturer la reverse transcriptase. Ensuite, 80 µL d'eau sont ajoutés pour atteindre une concentration finale de 50 ng/µL en ADNc. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### 11.2. PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR green

La qRT-PCR est réalisée dans une plaque 384 puits (*Thermo Scientific*), à raison de 10 ng d'ADNc par puits. A ceux-ci sont ajoutées les amorces nécessaires à l'amplification du gène d'intérêt à une concentration de 150 nM ainsi que le SensiMix SYBR Hi-ROX (*Bioline*), qui comporte une *HotStart DNA polymerase*, les dNTP, du MgCl<sub>2</sub>, ainsi que le SYBR green.

La lecture de la plaque est réalisée à l'aide du thermocycleur ABI 7900HT (*Applied Biosystems*). La plaque est soumise à une préincubation de 2 minutes à 50°C. Ensuite, elle est chauffée à 95°C durant 10 minutes de manière à activer l'ADN polymérase. Quarante cycles de PCR sont alors réalisés. Ceux-ci comprennent une phase de dénaturation de l'ADN, 15 secondes à 95°C, suivie d'une phase d'hybridation et d'élongation des amorces, 1 minute à 60°C.

Deux contrôles négatifs sont effectués. Le premier consiste à remplacer, lors du chargement de la plaque de qRT-PCR, l'échantillon par de l'eau. Ce contrôle permet de détecter la dimérisation éventuelle des amorces. Le second contrôle consiste à charger des échantillons d'ARN n'ayant pas subi l'étape de transcription inverse, de manière à s'assurer de l'absence d'amplification d'ADN génomique.

Après chaque étape d'élongation, le thermocycleur mesure la fluorescence des différents puits. Après 40 cycles de PCR, un CT (*Cycle Threshold*) est déterminé pour chaque échantillon. Ce seuil correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse une certaine valeur.

La normalisation des différents échantillons est effectuée grâce à l'utilisation des gènes *ppia* et *gapdh* humains. Le niveau d'expression d'un ARNm est enfin calculé par la formule  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen 2001) qui permet de normaliser la quantité d'ADNc présente initialement dans les échantillons.

### III. Objectif du travail

Les facteurs de croissance tels que le VEGF, le bFGF ou encore l'EGF sont des activateurs de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Le VEGF, étant impliqué dans toutes les étapes de l'angiogenèse, est le plus puissant et le plus étudié. C'est pourquoi de nombreuses thérapies visent à en inhiber ses effets pour empêcher le développement tumoral. Malheureusement, ces thérapies causent plusieurs types de résistance, dont la surexpression d'autres facteurs de croissance qui restaurent le développement tumoral. Il est donc important d'approfondir nos connaissances en ce qui concerne les divers facteurs de croissance, d'autant plus que leur signalisation est encore peu connue.

Prager et son équipe ont mis en évidence le rôle de l'uPAR dans la migration des CE induite par le VEGF mais aussi par d'autres facteurs de croissance. De plus, Balsara a montré que l'implication de l'uPAR ne se limite pas à la migration mais est aussi cruciale dans la prolifération et la tubulogenèse (Balsara et al. 2011). Cependant, d'après ces deux études, le rôle de l'uPAR dans l'angiogenèse se limite à celui de récepteur de l'uPA. Or, une étude réalisée dans notre laboratoire a montré que l'uPAR était directement impliqué dans les effets angiogènes du VEGF, via le VEGFR2.

Dès lors, l'objectif de ce travail est de déterminer si le rôle de l'uPAR est spécifique à la voie du VEGFR2 ou s'il est également requis pour l'angiogenèse induite par d'autres facteurs de croissance, dans notre cas le bFGF et l'EGF. Nous avons précédemment montré que l'uPAR interagit avec le VEGFR2. Nous avons donc imaginé que l'uPAR pourrait également interagir avec les récepteurs du bFGF, le FGFR1 et de l'EGF, l'EGFR. Afin de vérifier ces hypothèses, nous allons d'abord examiner si le VEGF, le bFGF et l'EGF induisent l'association de l'uPAR avec leurs récepteurs respectifs. Il s'agira ensuite d'analyser l'impact de l'uPAR dans la signalisation des facteurs et de leurs récepteurs. Enfin, l'uPAR étant un récepteur attaché à la membrane par une ancre GPI, il est principalement localisé au niveau des *lipid rafts*. Ces domaines membranaires pourraient donc être importants pour l'interaction de l'uPAR avec les récepteurs du bFGF, du VEGF et de l'EGF, mais aussi dans la signalisation des récepteurs s'associant à l'uPAR. Afin de vérifier ces hypothèses, nous analyserons l'impact de la destruction des *lipid rafts* sur la formation des complexes uPAR/récepteurs ainsi que sur la signalisation du VEGF, du bFGF et de l'EGF.

Dans un premier temps, nous étudierons les interactions des récepteurs avec l'uPAR et l'impact de l'uPAR sur leur signalisation. Ensuite, nous examinerons le rôle des *lipid rafts* à la fois dans la formation des complexes récepteurs/uPAR, ainsi que dans la signalisation des facteurs de croissances.

## IV. Résultats

### 1. Etude des complexes VEGFR2/uPAR, FGFR1/uPAR et EGFR/uPAR

Afin de mieux comprendre le rôle de l'uPAR dans la signalisation induite par le VEGF via le VEGFR2, le FGF via le FGFR1 et l'EGF via l'EGFR, nous nous sommes d'abord interrogés sur la capacité de l'uPAR à interagir avec les trois récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Dans ce but, nous avons eu recours à la technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA). Celle-ci permet de déterminer si deux protéines sont distantes de moins de 40 nm. Les deux protéines d'intérêt, à savoir uPAR et VEGFR2, FGFR1 ou EGFR, sont marquées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques produits à partir d'espèces différentes. Ensuite, deux anticorps secondaires couplés à des sondes ADN (PLA plus et minus) permettent la reconnaissance des anticorps primaires. Si les deux protéines sont distantes de moins de 40 nm, une étape de ligation permet la formation, à partir des deux sondes, d'un cercle d'ADN fermé. Une étape d'amplification permet de répliquer ce cercle par *rolling circle*. Des sondes fluorescentes couplées à des oligonucléotides peuvent alors s'hybrider au produit de cette amplification. Chaque point apparaissant correspond à une interaction entre les deux protéines.

Nous avons réalisé des PLA uPAR/VEGFR2, uPAR/FGFR1 et uPAR/EGFR sur des cellules HUVEC non perméabilisées. Celles-ci sont préalablement stimulées pendant 10 minutes avec du VEGF (50 ng/ml), du bFGF (20 ng/ml) ou de l'EGF (30 ng/ml). Cette technique nous permet d'observer que les facteurs de croissance induisent la formation de complexes entre leurs récepteurs et l'uPAR à la surface des HUVEC (**Figure 13**).

Afin de confirmer ce premier résultat, les interactions ont également été montrées par co-immunoprécipitation. Nous avons immunoprécipité, à l'aide de l'anticorps anti-uPAR, les extraits protéiques issus des cellules HUVEC non traitées ou traitées pendant 10 minutes avec chacun de nos trois facteurs de croissance. Les concentrations sont identiques à celles utilisées pour les PLA. La présence éventuelle des complexes uPAR/VEGFR2, uPAR/FGFR1 et uPAR/EGFR a été analysée par Western blotting via l'utilisation d'anticorps primaires reconnaissant le VEGFR2, le FGFR1 et l'EGFR. Afin de s'assurer de la validité de ces résultats, nous avons également immunoprécipité le VEGFR2 et le FGFR1 afin de regarder par Western blotting le niveau protéique d'uPAR. Suite à la stimulation par les facteurs de croissance, nous avons pu observer une augmentation de la formation du complexe d'environ 2,5 fois pour le complexe uPAR/VEGFR2 et, d'environ 2 à 4 fois pour le complexe uPAR/FGFR1. En conclusion, le VEGF, le bFGF et l'EGF (uniquement montré par PLA) induisent une augmentation de la formation de complexes entre leurs récepteurs respectifs et l'uPAR. (**Figure 14**).

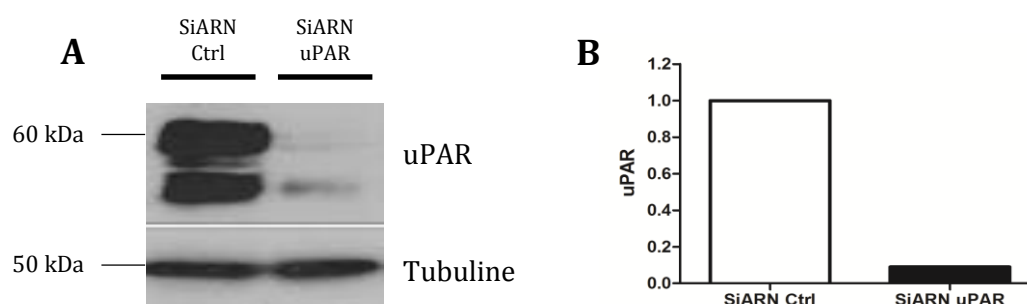
## 2. Etude de l'implication de l'uPAR dans les effets pro-angiogènes du VEGF, du bFGF et de l'EGF

Nous avons donc montré par immunoprécipitation et par PLA que les récepteurs des facteurs de croissance, à savoir VEGFR2, FGFR1 et EGFR, sont capables de former des complexes avec l'uPAR suite à leur activation. Nous avons ensuite examiné l'importance de l'uPAR dans la signalisation du VEGF, du bFGF et de l'EGF ; tous trois considérés comme des facteurs pro-angiogènes. L'utilisation de siARN ciblant l'uPAR, dans différents tests fonctionnels, nous a permis d'analyser l'implication de ce récepteur sur la prolifération, la migration et la survie des cellules HUVEC, induites par les trois facteurs de croissance.

### 2.1. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur le niveau protéique et sur le niveau de l'ARN messager de l'uPAR dans les cellules HUVEC

#### 2.1.1. Analyse de la diminution protéique par Western blotting

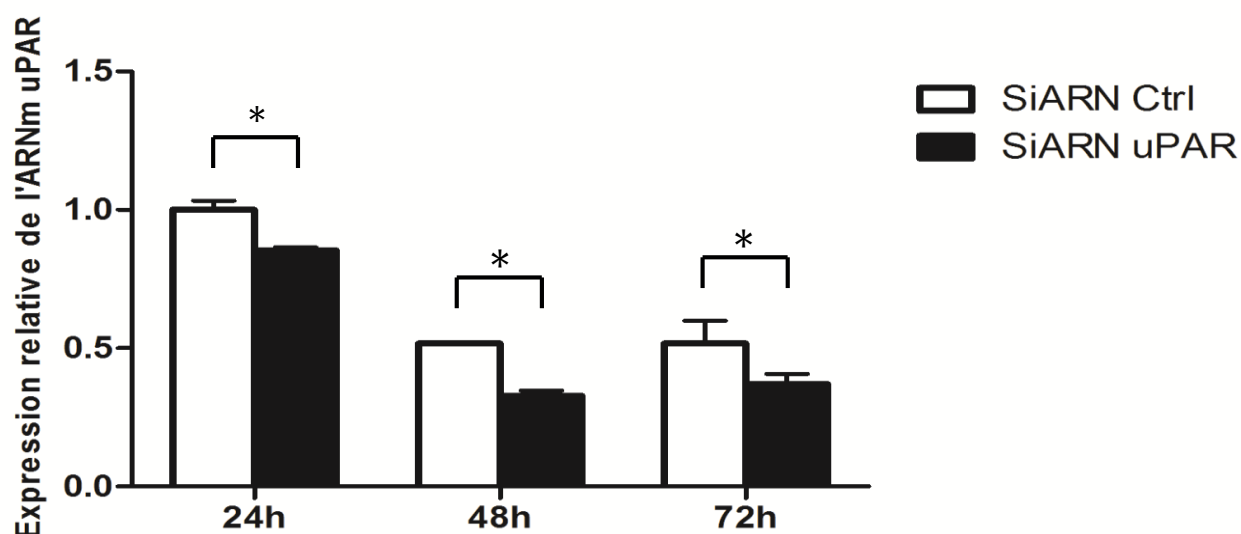
L'analyse par Western blotting a permis de montrer une diminution protéique de 90% de l'uPAR après 72 heures de transfection avec les siARN ciblant l'uPAR par rapport aux siARN contrôle (**Figure 15**). Afin de vérifier que cette diminution est bien due à l'effet des siARN et non à un problème de chargement, nous avons réalisé une révélation avec un anticorps anti-tubuline sur la même membrane. Ceci permet de conclure que ce sont les siARN qui provoquent la diminution protéique observée.



**Figure 15: Les siARN ciblant l'uPAR induisent une diminution protéique de l'uPAR.** Analyse des extraits protéiques des cellules HUVEC transfectées pendant 72 heures avec un siARN contrôlé (SiARN Ctrl) ou avec un siARN ciblant l'uPAR (SiARN uPAR) (50 nM) A) par Western blotting en utilisant un anticorps anti-uPAR. Un contrôle de chargement a été effectué à l'aide d'un anticorps ciblant la tubuline  $\beta$ . B) Quantification par densitométrie de l'uPAR présent dans les cellules transfectées avec un siARN contrôlé ou avec un siARN ciblant l'uPAR, réalisé avec ImageJ. Ratio uPAR/Tubuline normalisé par rapport au siARN contrôlé.

### 2.1.2. Analyse de la diminution des ARN messagers uPAR par qRT-PCR

L'analyse par qRT-PCR montre une diminution d'environ 35% du niveau d'ARN messager après 48 heures de transfection avec les siARN ciblant l'uPAR par rapport aux siARN contrôle (**Figure 16**). Afin de s'assurer que cette diminution est bien due aux siARN et non à un problème de manipulation, des contrôles utilisant les gènes *gapdh* et *ppia* ont été réalisés. Ceci permet de conclure que la diminution observée est bien due aux siARN ciblant l'uPAR.

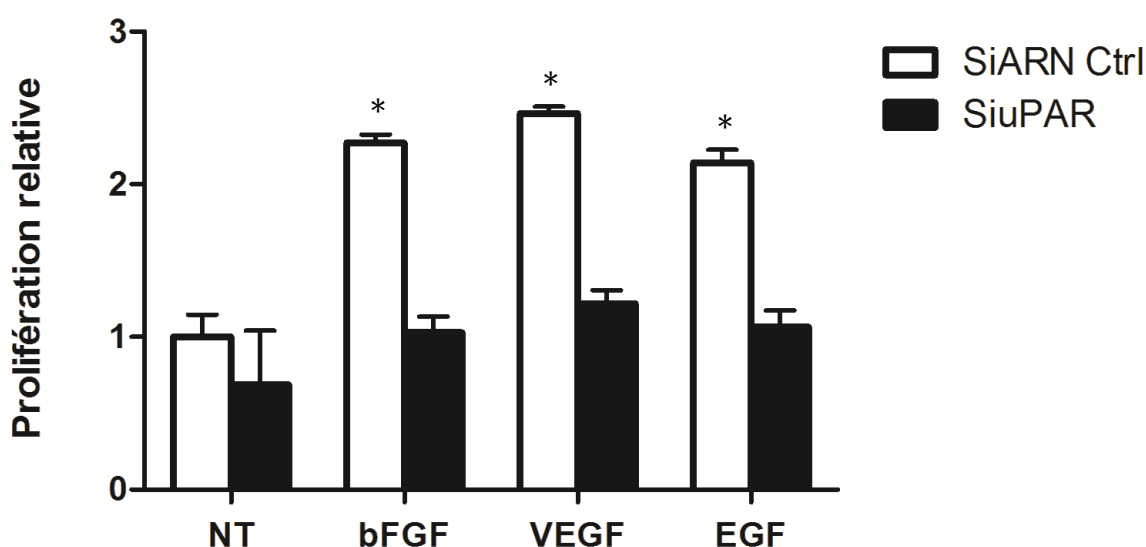


**Figure 16: Expression relative de l'ARN messager uPAR dans les cellules HUVEC transfectées.** Les cellules HUVEC ont été transfectées pendant 24, 48 ou 72h soit avec un siARN contrôle soit avec un siARN ciblant l'uPAR (50 nM). L'expression de l'ARNm d'uPAR est analysé par qRT-PCR. Les résultats sont normalisés par rapport aux gènes *gapdh* et *ppia*. Ces résultats sont présentés en moyenne + SD; \*  $P < 0,05$ .



## 2.2. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la prolifération induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF

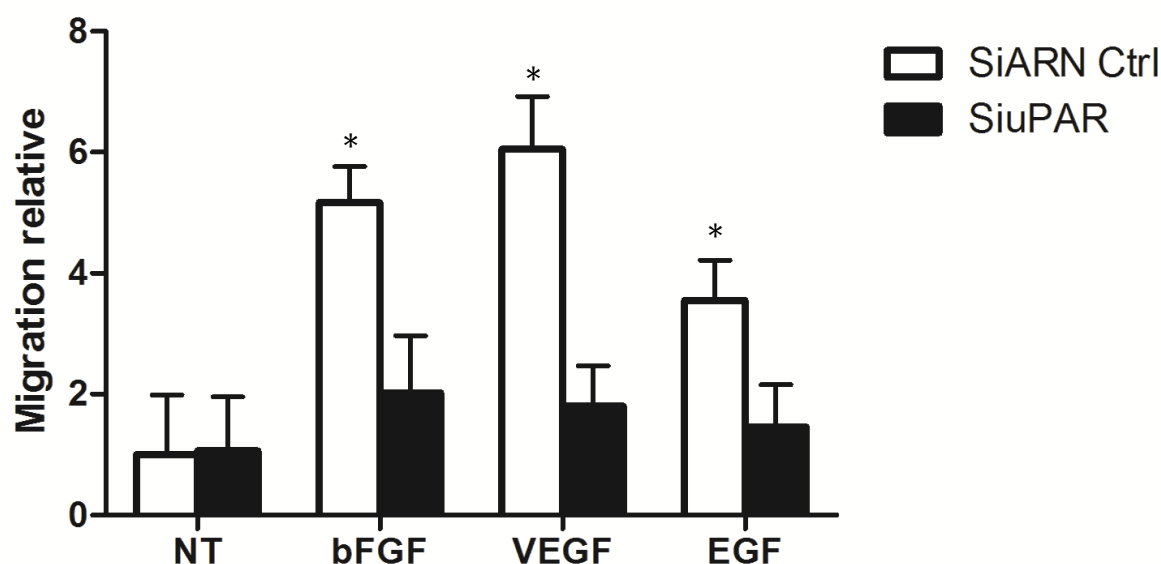
Un effet pro-angiogène du VEGF, du bFGF et de l'EGF est l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales. Afin d'analyser l'importance de l'uPAR dans ce processus, nous avons réalisé un test de prolifération BrdU sur des cellules HUVEC transfectées 72 heures à l'aide d'un siARN ciblant l'uPAR. Ces cellules sont ensuite traitées 24 heures avec le bFGF (20 ng/ml), le VEGF-A<sub>165</sub> (50 ng/ml) ou l'EGF (30 ng/ml). Nous avons pu observer que le bFGF, le VEGF et l'EGF augmentent de plus de 2 fois la prolifération des cellules endothéliales transfectées avec un siARN contrôle par rapport aux cellules non traitées par ces différents facteurs de croissance. Par contre, la capacité du bFGF, du VEGF et de l'EGF à induire la prolifération est diminuée d'approximativement 50% dans les cellules HUVEC transfectées avec un siARN ciblant l'uPAR (**Figure 17**). Nous pouvons donc conclure que l'uPAR joue un rôle important dans la prolifération induite par ces trois facteurs de croissance.



**Figure 17: Le bFGF, le VEGF et l'EGF requièrent l'uPAR pour induire la prolifération des cellules endothéliales.** Les cellules HUVEC ont été transfectées pendant 72h soit avec un siARN contrôle soit avec un siARN ciblant l'uPAR (50 nM). Elles ont ensuite été traitées ou non pendant 24h avec du bFGF (20 ng/ml), du VEGF (50 ng/ml) ou de l'EGF (30 ng/ml). La prolifération a été déterminée par la mesure de l'incorporation du BrdU dans l'ADN. La normalisation est effectuée par rapport au non traité (NT). Ces valeurs sont représentatives de minimum 3 expériences indépendantes et sont présentées en moyenne + SD; \* P < 0,05.

### 2.3. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la migration induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF

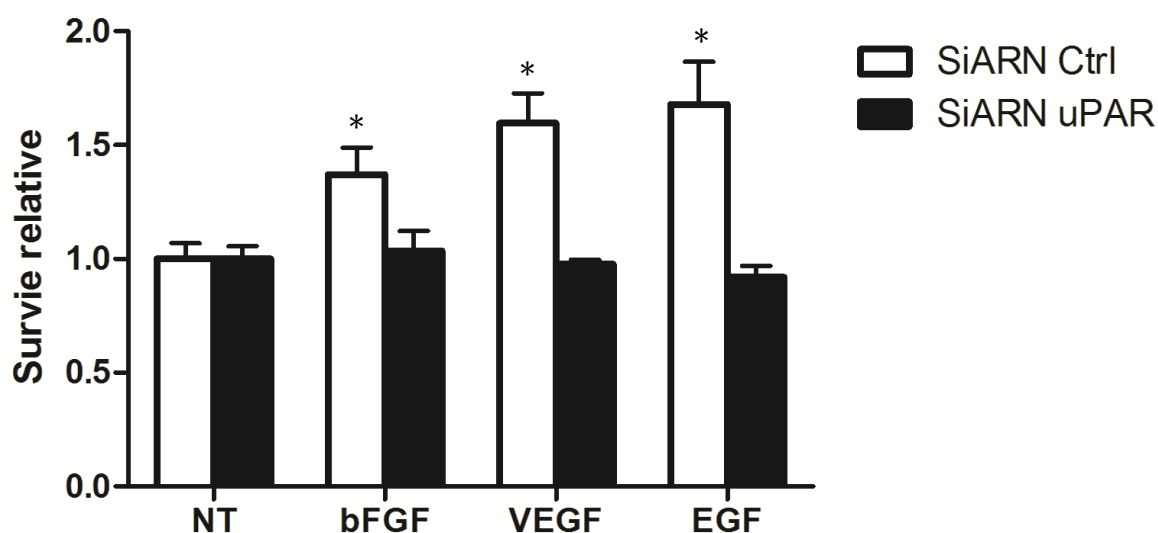
Un autre effet pro-angiogène connu du bFGF, du VEGF et de l'EGF est l'induction de la migration cellulaire. Afin de déterminer l'impact de l'uPAR sur la migration induite par ces facteurs, nous avons réalisé un *scratch test*. Les cellules transfectées 72 heures avec le siARN contrôle montrent une augmentation de la migration cellulaire suite aux traitements avec le bFGF, le VEGF et l'EGF par rapport aux cellules non traitées. Par contre, lorsque les cellules endothéliales sont transfectées avec le siARN ciblant l'uPAR cette capacité migratoire est fortement diminuée (**Figure 18**). Par conséquent, l'uPAR est un élément nécessaire au bFGF, au VEGF et à l'EGF pour induire la migration des cellules endothéliales HUVEC.



**Figure 18: Le bFGF, le VEGF et l'EGF requièrent l'uPAR pour induire la migration des cellules endothéliales.** Les cellules HUVEC ont été transfectées pendant 72h soit avec un siARN contrôle soit avec un siARN ciblant l'uPAR (50 nM). Un test de migration de 6h a ensuite été réalisé sur ces cellules transfectées traitées ou non avec du bFGF (20 ng/ml), du VEGF (50 ng/ml) ou de l'EGF (30 ng/ml). La normalisation est effectuée par rapport au non traité (NT) Ces valeurs sont représentatives de minimum 3 expériences indépendantes et sont présentées en moyenne + SD; \* P < 0,05

#### 2.4. Effet des siARN ciblant l'uPAR sur la survie cellulaire induite par le bFGF, le VEGF et l'EGF

Le bFGF, le VEGF et l'EGF sont trois facteurs également connus pour permettre de maintenir la survie cellulaire. Afin d'analyser l'implication de l'uPAR dans cette fonction contrôlée par ces trois facteurs, nous avons réalisé un test de survie WST-1. Nous avons observé que le bFGF, le VEGF ou l'EGF induisent une survie relative plus importante dans les cellules transfectées pendant 72 heures avec un siARN contrôle par rapport aux cellules non traitées. Par contre, lorsque la quantité protéique d'uPAR est diminuée par les siARN ciblant cette protéine, les facteurs de croissance n'induisent plus la survie des cellules (**Figure 19**). L'uPAR est donc essentiel au bFGF, au VEGF et à l'EGF pour stimuler la survie des cellules endothéliales.



**Figure 19: Le bFGF, le VEGF et l'EGF requièrent l'uPAR pour induire la survie des cellules endothéliales.** Les cellules HUVEC ont été transfectées pendant 72h soit avec un siARN contrôle soit avec un siARN ciblant l'uPAR (50 nM). Un test de survie WST-1 a été réalisé sur ces cellules transfectées traitées ou non avec du bFGF (20 ng/ml), du VEGF (50 ng/ml) ou de l'EGF (30 ng/ml). La normalisation est effectuée par rapport au non traité. Ces valeurs sont représentatives de minimum 3 expériences indépendantes et sont présentées en moyenne + SD; \*  $P < 0,05$

### *3. Etude de l'implication de l'uPAR dans les voies de signalisation du bFGF, et du VEGF*

Nous avons montré que l'uPAR est important pour les processus de prolifération, de survie et de migration cellulaires induits par le bFGF, le VEGF et l'EGF. Afin de comprendre plus en détail le rôle de l'uPAR, nous avons ensuite considéré son implication dans les voies de signalisation de ces trois facteurs. Dans ce but, nous avons transfecté les cellules HUVEC pendant 72 heures et nous les avons traitées au bFGF et au VEGF. Ensuite, par Western blotting, nous avons déterminé l'impact de l'inactivation de l'uPAR sur l'activation des ERK, après 10 minutes de traitement.

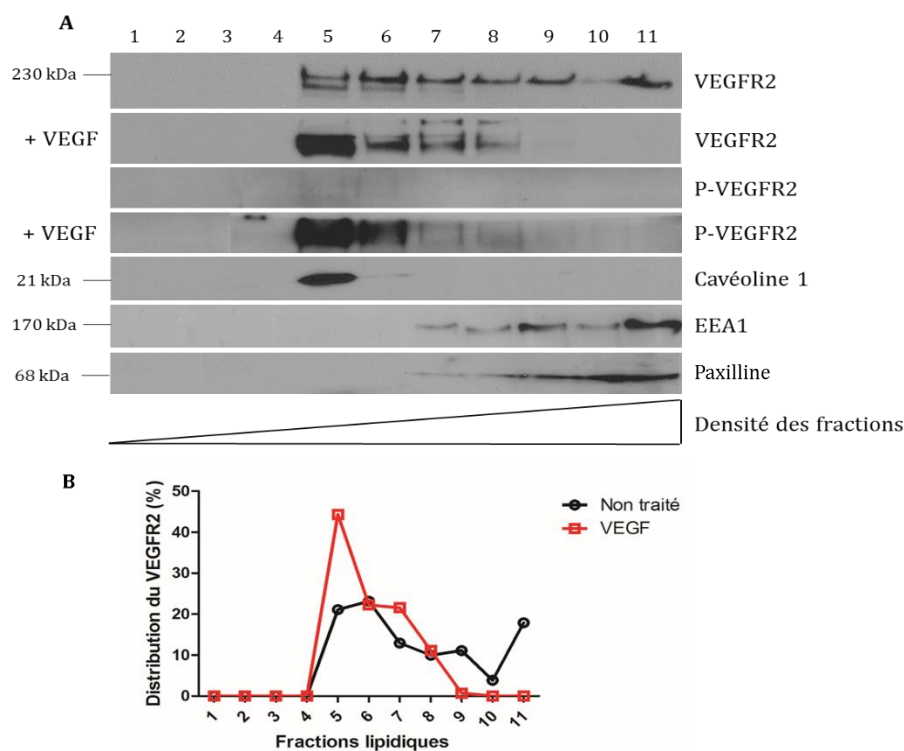
Les résultats obtenus indiquent que lorsque les HUVEC ne sont pas traitées, les ERK ne sont que faiblement activés. En effet, une très faible quantité de ces protéines est phosphorylée. Cependant, lorsque les cellules sont traitées avec du bFGF (20 ng/ml), et du VEGF (50 ng/ml) pendant 10 minutes, nous pouvons observer une augmentation de la phosphorylation des ERK d'approximativement 15 fois pour le bFGF et 30 fois pour le VEGF, par rapport aux cellules non traitées. Par contre, lorsque les cellules endothéliales sont transfectées à l'aide d'un siARN ciblant uPAR, l'induction de la phosphorylation est diminuée. En effet, nous avons observé une diminution de la phosphorylation des ERK d'environ 65% lorsqu'elle est induite par le bFGF et de 90% par le VEGF (**Figure 20**). Afin de s'assurer que ces observations sont bien dues à la diminution du niveau d'uPAR et non pas à des erreurs de chargements ou à une diminution de la quantité de la protéine entière suite à la transfection ou aux traitements, nous avons réalisé des Western blotting en utilisant des anticorps ciblant la tubuline et la totalité des ERK. En conclusion, l'uPAR est un co-récepteur du FGFR1 et du VEGFR2 et est indispensable pour leur permettre d'induire l'activation de la voie des ERK.

#### 4. Etude de la localisation d'uPAR à la surface des cellules endothéliales

Nous avons montré que l'uPAR est un élément indispensable aux fonctions et à la signalisation des facteurs de croissance et de leurs récepteurs. Nous nous sommes ensuite intéressés à sa localisation membranaire. En effet, ce récepteur est accroché à la membrane par une ancre GPI et est donc préférentiellement localisé dans les *lipid rafts*. De plus, les cellules endothéliales présentent un grand nombre de ces domaines. Il est donc intéressant de vérifier si l'uPAR est localisé au sein des *rafts* dans les cellules endothéliales. Dans ce cadre, nous avons réalisé des ultracentrifugations sur gradients de saccharose afin d'isoler les *lipid rafts*. La cavéoline-1 est une protéine qui constitue un certain type de *rafts*, les *caveolae*. Nous avons vérifié par Western blotting si les fractions de faible densité correspondent bien aux *rafts*, en révélant cette protéine. Nous nous sommes ensuite assurés que ces fractions n'étaient pas contaminées par des protéines appartenant à d'autres compartiments membranaires ou par des protéines cytoplasmiques. A cette fin, nous avons contrôlé, par Western blotting, le niveau protéique d'EEA-1 (marqueurs des endosomes précoces) et de la paxilline (protéine cytoplasmique). Ensuite, nous avons réalisé un Western blotting afin de déterminer la distribution d'uPAR au sein des différentes fractions. Nous avons observé que ce dernier est localisé à 60% dans la fraction 5 (**Figure 21**) qui correspond aux *lipid rafts*. En conclusion, nous pouvons affirmer qu'uPAR est présent en grande quantité dans les *lipid rafts* des cellules endothéliales.

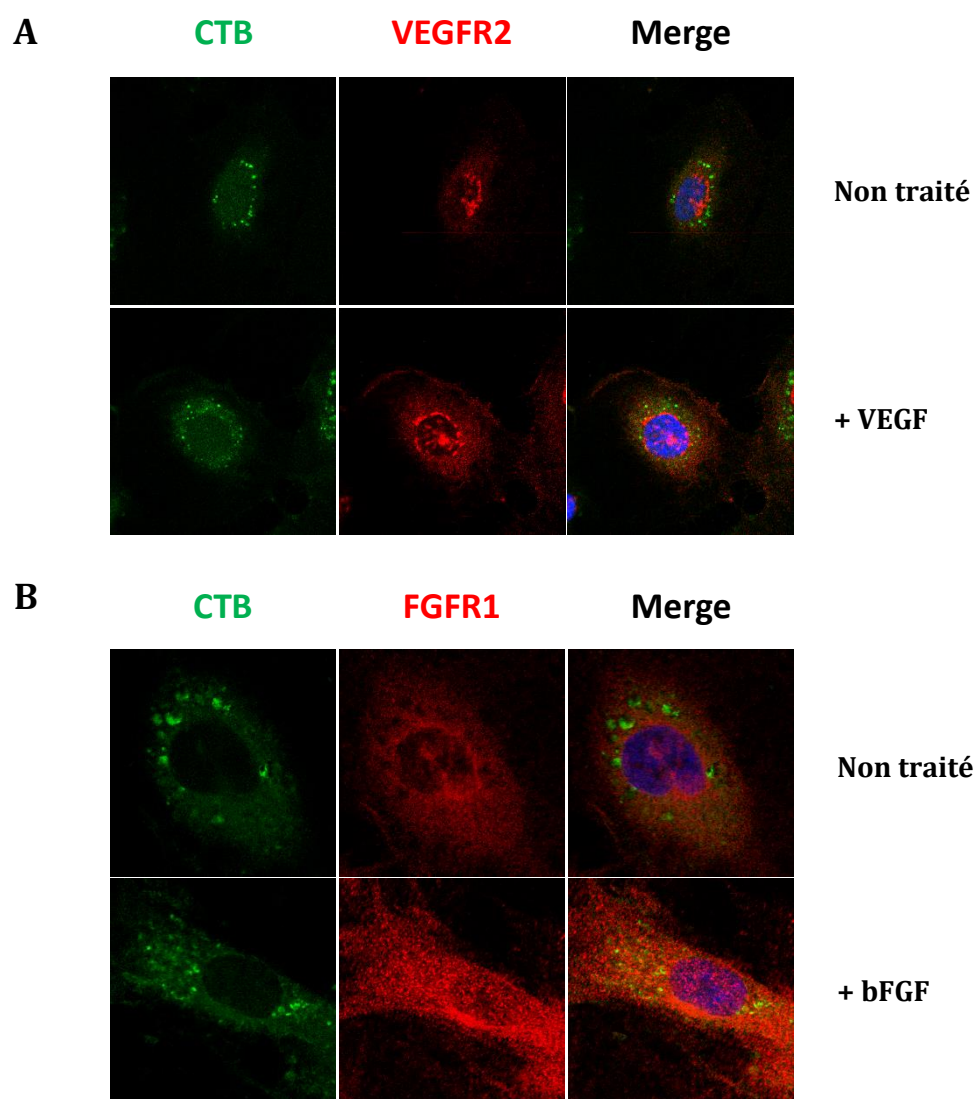
## 5. Etude de la localisation membranaire du FGFR1 et du VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales

Par ces différents résultats, nous avons mis en évidence l'interaction de l'uPAR avec les récepteurs FGFR1, VEGFR2 et EGFR et le rôle de l'uPAR dans les fonctions induites par le bFGF, le VEGF et l'EGF. De plus, nous avons montré que l'uPAR est majoritairement localisé dans les *lipid rafts* à la surface des cellules endothéliales. Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation membranaire des récepteurs des facteurs de croissance et à leur éventuel déplacement suite à leur activation. Dans ce but, nous avons réalisé des ultracentrifugations sur gradients de saccharose à partir d'HUVEC non traitées et traitées 5 minutes avec du VEGF (50 ng/ml). Nous avons observé, par Western blotting, que dans les cellules non stimulées, la distribution du VEGFR2 couvre toutes les fractions (**Figure 22**). En effet, il est présent dans les fractions 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11. Et, lorsque ces cellules sont stimulées avec le VEGF, la localisation du récepteur VEGFR2 est fortement modifiée et subit un déplacement important dans la fraction 5 correspondant aux *lipid rafts* (**Figure 22**). Cette expérience nous a permis de montrer que suite à la stimulation par son facteur de croissance, le VEGFR2 est déplacé vers les *rafts*.



**Figure 22: Le VEGFR2 se déplace dans les *rafts* suite à la stimulation des cellules endothéliales.** Les cellules endothéliales HUVEC non traitées et traitées au VEGF (50 ng/ml) ont été soumises à une ultracentrifugation sur gradients de saccharose afin d'isoler les *lipid rafts*. A) Analyse de la distribution de VEGFR2 et de phospho-VEGFR2 au sein de ces fractions par Western blotting. La cavéoline-1 sert de marqueur des fractions *rafts*. EEA1 sert de marqueur des endosomes et paxilline sert de marqueur des fractions dites non *rafts*. B) Quantification de la distribution du VEGFR2 dans les fractions lipidiques des HUVEC par densitométrie (Image)).

Afin de confirmer ce résultat, nous avons procédé à des co-localisations en utilisant la toxine B du choléra comme marqueur des *lipid rafts* et un anticorps anti VEGFR2 sur des cellules HUVEC non perméabilisées. Les résultats exposés sur la **figure 23 A** confirment la localisation du récepteur VEGFR2 (rouge) dans les *rafts* (vert) à la surface des cellules HUVEC stimulées par le VEGF. Nous avons également réalisé une co-localisation du FGFR1 et des *rafts*. Nous pouvons observer sur la **figure 23 B** qu'un traitement de 5 minutes au bFGF induit le recrutement du FGFR1 au sein des *lipid rafts*. Nous pouvons conclure que le bFGF et le VEGF entraînent une redistribution de leurs récepteurs dans les *lipid rafts* des HUVEC.



**Figure 23: Le VEGF et le bFGF induisent la redistribution de leurs récepteurs respectifs au sein des *lipid rafts* à la surface des cellules HUVEC.** Observation au microscope confocal des cellules HUVEC non perméabilisées après un marquage des *rafts* par la toxine B du choléra couplée à une sonde fluorescente, un marquage du FGFR1 ou du VEGFR2. A) Les cellules sont traitées ou non au VEGF (50 ng/ml) et la co-localisation du VEGFR2 avec les *rafts* est analysée. B) Les cellules HUVEC sont traitées ou non au bFGF (20 ng/ml) et la co-localisation du FGFR1 avec les *rafts* est analysée. En vert, marquage des *rafts*; En bleu marquage au DAPI des noyaux; En rouge, marquage du A) VEGFR2 et B) FGFR1. Grossissement 40X.

## 6. Etude de l'importance des lipid rafts dans la formation des complexes FGFR1/uPAR, et VEGFR2/uPAR

Les résultats précédents ont permis de mettre en évidence la localisation de l'uPAR et des récepteurs aux facteurs de croissance FGFR1 et VEGFR2, suite à la stimulation par leur facteur respectif, dans les *lipid rafts*, des cellules endothéliales. Nous nous sommes donc demandés si la formation des complexes récepteurs aux facteurs de croissance/uPAR requiert ou non l'intégrité des *rafts*. Dans ce cadre, nous avons réalisé des PLA sur des cellules HUVEC non perméabilisées, préalablement traitées 1 heure à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) (10 mM), un destructeur des *rafts*, et ensuite pendant 10 minutes avec du bFGF (20 ng/ml) et du VEGF (50 ng/ml). Ces expériences nous ont permis d'observer que les cellules traitées avec la M $\beta$ CD présentent moins de points rouges que les cellules pour lesquelles les *rafts* sont intacts. La formation des complexes FGFR1/uPAR, VEGFR2/uPAR, suite aux stimulations par le bFGF, le VEGF respectivement, est donc moins importante en l'absence de ces microdomaines (**Figure 24**). En conclusion, la formation des complexes FGFR1/uPAR et VEGFR2/uPAR induite par leur facteur de croissance a besoin des *lipid rafts* intacts.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons effectué une co-immunoprécipitation de l'uPAR, à l'aide d'un anticorps anti-uPAR, sur les extraits protéiques issus des cellules HUVEC non traitées ou traitées 1 heure à la M $\beta$ CD suivi ou non d'un traitement de 10 minutes avec du bFGF (20 ng/ml). Nous avons ensuite étudié, par Western blotting, la présence éventuelle de complexe uPAR/FGFR1 par l'intermédiaire d'anticorps anti-FGFR1. Ce résultat montre que la stimulation par le bFGF induit une augmentation de presque 2 fois du complexe uPAR/FGFR1. Par contre, la destruction des *rafts* diminue d'environ 40% la capacité du bFGF à induire la formation du même complexe (**figure 25**). Nous pouvons donc conclure que les radeaux lipidiques sont des éléments essentiels pour la formation du complexes uPAR/FGFR1.



## 7. Etude de l'implication des lipid rafts dans les voies de signalisation du bFGF, du VEGF, et de l'EGF

Les résultats précédents indiquent que sous la stimulation par le bFGF et le VEGF, les récepteurs sont redistribués au sein des *rafts* et que ces *rafts* sont importants pour la formation des complexes entre leurs récepteurs et l'uPAR. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de ces microdomaines membranaires dans la signalisation des facteurs de croissance. Dans ce but, nous avons traité, pendant 1 heure, les cellules endothéliales HUVEC avec de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (10 mM). Ensuite, ces cellules ont été traitées 10 minutes avec du bFGF (20 ng/ml), du VEGF (50 ng/ml) ou de l'EGF (15 ng/ml). Nous avons enfin observé, par Western blotting, l'impact de la destruction des radeaux lipidiques sur la phosphorylation des ERK et d'AKT, induite par les facteurs de croissance, via l'utilisation d'anticorps anti-phospho-ERK et anti-phospho-AKT.

La stimulation des cellules HUVEC par le bFGF, le VEGF et l'EGF permet l'activation des voies ERK et AKT en augmentant leur niveau de phosphorylation. Cependant, lorsque les cellules sont traitées avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, nous observons une forte diminution de ces activations, que ce soit pour ERK ou pour AKT (**Figure 26**). Afin de s'assurer que cette diminution est uniquement due à la destruction des *lipid rafts* et non pas à une diminution du niveau protéique d'uPAR, de FGFR1, de VEGFR2, des ERK ou d'AKT totaux suite au traitement à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, nous avons vérifié, par Western blotting, le niveau de ces différentes protéines dans les extraits d'HUVEC traitées ou non avec la M $\beta$ CD. Nous avons également utilisé un anticorps anti-tubuline pour s'assurer de la qualité du chargement des protéines sur gel. En conclusion, l'intégrité des *lipid rafts* est indispensable au bFGF, au VEGF et à l'EGF pour induire l'activation des voies ERK et AKT.

## V. Discussion et conclusion

### 1. Discussion

Le VEGF est connu depuis longtemps pour son caractère pro-angiogène. En effet, il est un puissant activateur de l'angiogenèse physiologique mais aussi pathologique, notamment dans l'angiogenèse tumorale. Dans ce cadre, il constitue une cible idéale pour combattre certains cancers. A l'heure actuelle, il existe déjà de nombreux traitements utilisant des anticorps thérapeutiques ciblant le VEGF, comme le bevacizumab ou le ranibizumab. Cependant, un problème majeur subsiste. En effet, les cellules tumorales sont capables de mettre en place des mécanismes de résistance, comme la surexpression d'autres facteurs angiogènes (le FGF, l'EGF, le PlGF, les chémokines, les éphrines). Ces facteurs permettent de compenser l'absence du VEGF et restaurent ainsi l'angiogenèse tumorale (Carmeliet and Jain 2011). Il est donc important de comprendre les modes de signalisation du VEGF, mais également des autres facteurs de croissance afin de pouvoir développer des thérapies plus adéquates. Prager et ses collaborateurs ont montré que l'uPAR joue un rôle dans la migration des CE induite par plusieurs facteurs de croissance comme le VEGF, l'EGF, le bFGF ou le HGF. Il a également été montré que dans les cellules endothéliales dépourvues d'uPAR, l'induction de l'angiogenèse, notamment de la migration, de la prolifération et de la tubulogenèse, est altérée (Balsara et al. 2011). La capacité des récepteurs de type tyrosine kinase comme le VEGFR2, mais aussi le FGFR1 et l'EGFR d'interagir avec divers co-récepteurs pour moduler leur signalisation est de plus en plus étudiée. Parmi ces co-récepteurs, NRP-1 est un des plus connus pour le VEGFR2 (Soker et al. 1998), mais il a aussi été montré que l'éphrin-B2 peut jouer un rôle de co-récepteur du VEGFR2 (Sawamiphak et al. 2010). Le syndécan 4 (récepteur membranaire portant des chaînes de type héparane sulfate), quant à lui, est un des co-récepteurs du FGFR1 permettant de moduler l'activation des ERK (Chua et al. 2004). Ce protéoglycan agit notamment sur l'internalisation des complexes bFGF/FGFR1 (Elfenbein et al. 2012). Cependant, il en existe de nombreux autres comme les intégrines et la N-cadhérine (Murakami et al. 2008). EGFR peut également s'associer à divers co-récepteurs comme les intégrines, NRP-1 (*Neuropilin-1*) (Rizzolio et al. 2012), ainsi que les autres récepteurs de la famille ErbB.

Dans le cadre de ce mémoire, l'objectif était de déterminer le rôle exact de l'uPAR dans la signalisation de trois facteurs clés de l'angiogenèse, le bFGF, le VEGF et l'EGF. La littérature nous a permis d'émettre une première hypothèse qui a orienté le début de ce travail. L'uPAR serait un co-récepteur, non seulement pour le VEGFR2, mais également pour les récepteurs du bFGF et de l'EGF. Ces voies de signalisation sont fort peu étudiées dans les CE. Néanmoins, plusieurs études

ont montré que le bFGF agit sur les CE principalement par le FGFR1 et l'EGF par l'EGFR. Afin de tester notre hypothèse, nous avons regardé par PLA et par co-immunoprécipitation une éventuelle association entre l'uPAR et nos trois récepteurs, à savoir le VEGFR2, le FGFR1 et l'EGFR. Ces deux techniques nous ont permis de montrer que la stimulation des cellules par le bFGF, le VEGF ou l'EGF permet la formation de complexes, à la surface des cellules endothéliales, entre l'uPAR et le FGFR1 mais aussi entre l'uPAR et le VEGFR2 et enfin entre l'uPAR et l'EGFR. La liaison de ces 3 facteurs à leurs récepteurs respectifs permet donc la formation des complexes récepteur/uPAR. Nous nous sommes demandés ensuite si la signalisation du bFGF, du VEGF et de l'EGF requiert l'uPAR.

Dans ce but, nous avons réalisé une transfection sur des cellules HUVEC à l'aide de siARN contrôle et de siARN ciblant l'uPAR (50 nM). Cette technique nous permet de diminuer fortement le niveau protéique de l'uPAR après 72h de transfection et ainsi d'analyser l'effet de sa déplétion sur les fonctions angiogènes du bFGF, du VEGF et de l'EGF. Nous avons ainsi analysé, par différents tests fonctionnels, la capacité du bFGF, du VEGF et de l'EGF à induire la prolifération, la migration, et la survie des cellules endothéliales transfectées avec les siARN ciblant l'uPAR (50 nM) comparées à celles transfectées avec un siARN contrôle. Ces expériences nous ont permis de conclure que l'absence de l'uPAR à la surface des cellules HUVEC engendre l'incapacité du bFGF, du VEGF et de l'EGF à induire la prolifération, la migration, et la survie de ces cellules. Ces résultats permettent ainsi d'affirmer que l'uPAR est un co-récepteur du FGFR1, du VEGFR2 et de l'EGFR, nécessaire pour leurs effets angiogènes. Il y a quelques années, Prager et ses collègues avaient montré l'importance du l'uPAR dans la migration des cellules endothéliales. Cependant, dans cette étude, ce n'est que l'uPAR en tant que récepteur de l'uPA qui est considéré comme impliqué dans le phénomène migratoire. En effet, suite à la stimulation par le VEGF, par l'intermédiaire de la voie PI3K/intégrines $\beta$ 1/MMP2, le pro-uPA lié à l'uPAR est activé et un complexe uPA/uPAR/PAI-1 se forme. Ce complexe est alors internalisé grâce à une interaction supplémentaire avec un récepteur de type LDL. Cette internalisation mène alors au recyclage de l'uPAR au niveau des adhésions focales et permet la migration cellulaire (Prager et al. 2004). Notre étude, quant à elle, a permis de montrer que le rôle de l'uPAR est plus complexe et n'est pas restreint à son implication dans la protéolyse. En effet, il est capable d'interagir avec les récepteurs des facteurs de croissance et est non seulement impliqué dans la migration mais également dans la prolifération et la survie des cellules endothéliales contrôlées par le bFGF, le VEGF et l'EGF.

Ainsi, après avoir déterminé que l'uPAR est indispensable aux activités angiogènes du bFGF, du VEGF et de l'EGF, nous nous sommes demandés quel pouvait être l'impact de sa déplétion sur la signalisation induite par ces facteurs. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé plusieurs Western blotting sur les extraits protéiques de cellules HUVEC transfectées avec un

siARN contrôle ou un siARN ciblant l'uPAR. Il apparaît clairement que dans les cellules déplétées en uPAR, la phosphorylation des ERK, induite par le bFGF et le VEGF, est diminuée. Par ailleurs, nous avons précédemment montré dans le laboratoire que l'induction de la phosphorylation de la tyrosine 1175 du VEGFR2 induite par le VEGF requiert également l'uPAR.

La tyrosine 1175 du VEGFR2 est le site principalement impliqué dans l'angiogenèse. En effet, la substitution de cette tyrosine par une phénylalanine engendre la mort des embryons murins (E 8,5 – 9). Cette létalité est due à un développement vasculaire insuffisant car la voie PLC $\gamma$ /PKC/MAPK n'est plus activée (Sakurai et al. 2005). Il n'est donc pas étonnant que la diminution de l'uPAR engendre aussi une diminution de la phosphorylation des ERK car la tyrosine 1175 est le site de fixation pour la PLC $\gamma$  conduisant à l'activation de la voie des ERK par le VEGFR2 (Takahashi et al. 2001). Il serait donc intéressant d'analyser si l'uPAR contrôle également la phosphorylation de certaines tyrosines particulières du FGFR1 ainsi que des voies de signalisation activées par l'intermédiaire de ces résidus. Nous pourrions aussi étudier l'implication du récepteur de l'urokinase dans la phosphorylation des tyrosines de l'EGFR et dans les voies de signalisation activées suite à la stimulation par l'EGF.. Il semble donc possible que le mécanisme d'activation de l'EGFR, du FGFR1 et de leurs voies de signalisation suive le même schéma que pour VEGFR2.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré l'implication de l'uPAR dans la régulation des fonctions et des voies de signalisation activées par le bFGF, le VEGF et l'EGF. L'uPAR, en tant que récepteur accroché à la membrane par un lien GPI, est localisé au sein des *lipid rafts*. De nombreux articles montrent que ces microdomaines sont nécessaires à ses fonctions protéolytiques (Stahl and Mueller 1995, Sahores et al. 2008). Dans le cadre de ce mémoire, nous avons effectué des ultracentrifugations afin d'isoler les *lipid rafts* des cellules endothéliales. Nous avons pu ainsi déterminer que, dans les cellules HUVEC, l'uPAR est principalement localisé au sein des *lipid rafts* et distribué de manière moins importante dans les autres fractions lipidiques.

L'uPAR est donc un récepteur présent au sein des *rafts*. Nous avons ensuite déterminé si les récepteurs FGFR1, VEGFR2 et EGFR pouvaient, eux aussi, être localisés dans ces microdomaines membranaires. La comparaison, par Western blotting, de la répartition du VEGFR2 dans les fractions lipidiques des HUVEC traitées ou non avec le VEGF, nous a permis de montrer que la stimulation des cellules par le facteur de croissance VEGF (5 minutes de traitement) mène à une redistribution plus importante du récepteur au sein des *rafts*. Nous avons confirmé ce résultat par immunohistochimie. En effet, ce moyen nous a permis de montrer que le VEGFR2 co-localise avec la toxine B du choléra, un marqueur de *rafts*, suite à un traitement de 5 minutes au VEGF. Nous avons également observé que le bFGF induit la co-localisation du FGFR1

avec les *rafts*. Il nous reste donc à déterminer si l'EGF entraîne également une telle relocalisation de son récepteur, l'EGFR.

Ces résultats nous ont permis d'émettre deux autres hypothèses. Les *rafts* pourraient être requis pour la formation des complexes RTK/uPAR et pourraient également être nécessaires pour la signalisation du bFGF, du VEGF et de l'EGF.

Afin de vérifier ces hypothèses nous avons eu recours à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine qui permet la destruction des *lipid rafts*. Cette molécule enlève le cholestérol de la membrane plasmique causant la destruction des *lipid raft*. De nombreux articles récents ont montré, par cette technique, l'importance des *rafts* dans la signalisation et les fonctions de l'uPAR, ainsi que de nombreuses autres protéines membranaires (Sahores et al. 2008, Raghu et al. 2010). Il a été observé que l'uPAR est localisé au sein des *rafts* et que l'intégrité de ces domaines est nécessaire pour l'activité protéolytique de l'uPA (Raghu et al. 2010). Sahores a également montré l'impact de la destruction des *rafts* sur le niveau de phosphorylation des ERK induit par l'uPA. Cet article mentionne également que la liaison de l'uPA à son récepteur augmente le niveau d'uPAR déjà présent dans les radeaux lipidiques. Cette localisation est importante pour le contrôle de l'adhésion, de la migration, de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Sahores et al. 2008). Les *lipid rafts* sont donc des domaines importants pour les fonctions et la signalisation de l'uPAR. Nous avons précédemment montré que ce récepteur interagit avec le FGFR1, le VEGFR2 et l'EGFR. Ceci conforte notre première hypothèse concernant le rôle des *rafts* dans la formation des complexes RTK/uPAR.

Dans ce cadre, des PLA sur des cellules HUVEC et des co-immunoprécipitations sur leurs extraits ont été effectués. Les cellules ont été préalablement traitées ou non pendant 1 heure à la cyclodextrine (10 mM) avant de subir les traitements au bFGF (20 ng/ml) ou au VEGF (50 ng/ml). Les expériences de PLA nous ont permis de montrer que la destruction des *rafts* diminue fortement la formation des complexes FGFR1/uPAR et VEGFR2/uPAR, induite par le bFGF et le VEGF. Il serait intéressant de déterminer si la formation du complexe EGFR/uPAR, induite par l'EGF, est également affectée par la destruction des *lipid rafts*. Nous avons confirmé par co-immunoprécipitation le résultat obtenu pour le complexe FGFR1/uPAR. Par conséquent, ces résultats nous permettent de conclure que les *lipid rafts* sont indispensables à la formation des complexes FGFR1/uPAR et VEGFR2/uPAR.

Précédemment dans ce mémoire, nous avons montré l'importance de l'uPAR dans la signalisation et les fonctions angiogènes du bFGF, du VEGF et de l'EGF. Nous avons aussi montré que ces facteurs induisent la formation de complexes entre l'uPAR et les récepteurs aux facteurs de croissance. Le résultat précédent indique que les *lipid rafts* sont nécessaires à la formation de

ces complexes. Au vu de ces résultats, il est logique de se poser la question suivante : les radeaux lipidiques sont-ils nécessaires à la signalisation des facteurs de croissance ?

Nous nous sommes donc intéressés à notre deuxième hypothèse, selon laquelle les microdomaines membranaires des cellules endothéliales seraient importants pour la signalisation du bFGF, du VEGF et de l'EGF. Dans ce but, les cellules HUVEC ont été traitées ou non avec de la cyclodextrine (10 mM) pendant 1 heure avant d'être traitées ou non avec du bFGF (20 ng/ml), du VEGF (50 ng/ml) ou de l'EGF (15 ng/ml) pendant 10 minutes. Nous avons ensuite analysé les extraits protéiques de ces cellules par Western blotting. Il apparaît clairement que la capacité de ces trois facteurs à induire la phosphorylation des ERK et d'AKT est fortement diminuée dans les cellules traitées à la M $\beta$ CD. Labrecque a montré, en 2003, un effet similaire dans les cellules endothéliales bovines. En effet, la déplétion du cholestérol au sein des cellules BAEC (*Bovin Aortic Endothelial Cells*) induit, notamment, une diminution de l'activation des ERK par le VEGF (Labrecque et al. 2003). En conclusion, les *lipid rafts* sont non seulement essentiels à la formation des complexes récepteurs/uPAR, mais aussi à la signalisation du bFGF, du VEGF et de l'EGF. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la cyclodextrine sur la phosphorylation des récepteurs induite par les facteurs de croissance.

## 2. Conclusion générale

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un modèle partiel du mécanisme d'action du bFGF, du VEGF et de l'EGF. La stimulation et donc la fixation du facteur de croissance sur son récepteur engendre une redistribution de celui-ci au sein des microdomaines membranaires appelés les *lipid rafts* et permet l'interaction de l'uPAR avec son récepteur. Ces complexes localisés au sein des *rafts* sont alors capables de transmettre leur signal par l'intermédiaire de la phosphorylation de résidus tyrosines présents sur le domaine cytoplasmique des récepteurs. Ces sites recrutent alors divers adaptateurs menant à l'activation des voies ERK et AKT et à la stimulation de la prolifération, de la migration et de la survie cellulaires (**Figure 27**). Lorsque la formation des complexes est bloquée, par l'intermédiaire de siARN ciblant l'uPAR, la capacité du VEGF et du bFGF à activer la voie des ERK est diminuée. De plus, la destruction des *rafts* engendre à la fois une diminution de la formation des complexes RTK/uPAR ainsi que de la phosphorylation des ERK et d'AKT.

En conclusion, l'uPAR est un co-récepteur du FGFR1, du VEGFR2 et de l'EGFR qui leur permet d'assurer leurs fonctions angiogènes. La co-localisation de l'uPAR et de ces trois récepteurs au sein des *lipid rafts* est indispensable à la formation des complexes et à la signalisation induites par le bFGF, le VEGF et l'EGF.

Afin d'affiner ce modèle, il serait intéressant d'obtenir l'ensemble des résultats concernant l'EGFR, mais aussi de déterminer si c'est l'uPAR qui est responsable du recrutement des RTK au sein des *rafts* après leur stimulation. Dans ce but, nous allons transfecter les cellules HUVEC avec des siARN ciblant l'uPAR. Nous pourrions ensuite regarder, par co-localisation et par isolation des *rafts*, si cette déplétion affecte ou non un tel recrutement des RTK dans ces microdomaines.

Il serait également intéressant d'étendre cette étude à d'autres facteurs de croissance comme l'HGF. Ceci permettrait de renforcer l'hypothèse selon laquelle l'uPAR joue un rôle central dans la signalisation des facteurs de croissance. Dès lors, l'uPAR serait une cible de choix pour combattre le cancer et diminuer les phénomènes de compensation et de résistance aux thérapies existantes.

Ensuite, il serait également intéressant d'étudier le trafficking intracellulaire des récepteurs et de l'uPAR en analysant d'une part l'effet de l'inhibition de l'internalisation des complexes et, d'autre part leur localisation au sein de compartiments intracellulaires. En effet, des expériences de co-localisation des récepteurs avec les différents Rab (marqueur des différents types de vésicules intracellulaires) nous permettraient de mieux comprendre le destin intracellulaire des différents récepteurs. Le *trafficking* du VEGFR2 est abondamment étudié et il en ressort que suite à la stimulation par son facteur de croissance, le VEGFR2 est internalisé. Cette internalisation est notamment nécessaire pour l'activation de la voie des ERK et pour le maintien de la phosphorylation de la tyrosine 1175 (Lampugnani et al. 2006, Lanahan et al. 2010, Sawamiphak et al. 2010). Les informations concernant l'internalisation du FGFR1 et de l'EGFR sont moins nombreuses et inexistantes en ce qui concerne les CE. En effet, la plupart des articles existants considèrent que l'internalisation de ces deux récepteurs mène à l'atténuation du signal. Cependant, certains groupes mentionnent la possibilité que l'internalisation du FGFR1 et de l'EGFR permettent de prolonger la signalisation intracellulaire (Wang et al. 2002, Irschick et al. 2013). Dès lors, l'étude de l'implication de l'inhibition de l'internalisation sur les effets angiogènes du FGFR1 et de l'EGFR nous permettraient de répondre à cette question. Enfin, le rôle de l'uPAR et des *lipid rafts* dans ce trafic intracellulaire pourrait aussi être étudié.

## VI. Bibliographie

- Alfano, D., P. Franco, I. Vocca, N. Gambi, V. Pisa, A. Mancini, M. Caputi, M. V. Carriero, I. Iaccarino and M. P. Stoppelli (2005). "The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis." Thromb Haemost **93**(2): 205-211.
- Balsara, R. D., R. Merryman, F. Virjee, C. Northway, F. J. Castellino and V. A. Ploplis (2011). "A deficiency of uPAR alters endothelial angiogenic function and cell morphology." Vasc Cell **3**(1): 10.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem and M. Tomic-Canic (2008). "Growth factors and cytokines in wound healing." Wound Repair Regen **16**(5): 585-601.
- Binder, B. R., J. Mihaly and G. W. Prager (2007). "uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view." Thromb Haemost **97**(3): 336-342.
- Blanes, M. G., M. Oubaha, Y. Rautureau and J. P. Gratton (2007). "Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells." J Biol Chem **282**(14): 10660-10669.
- Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 932-943.
- Blasi, F. and N. Sidenius (2010). "The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling." FEBS Lett **584**(9): 1923-1930.
- Breuss, J. M. and P. Uhrin (2012). "VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system." Cell Adh Migr **6**(6): 535-615.
- Cao, Y., P. Linden, D. Shima, F. Browne and J. Folkman (1996). "In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor." J Clin Invest **98**(11): 2507-2511.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P., F. De Smet, S. Loges and M. Mazzone (2009). "Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way." Nat Rev Clin Oncol **6**(6): 315-326.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.
- Caron, C., K. Spring, M. Laramee, C. Chabot, M. Cloutier, H. Gu and I. Royal (2009). "Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells." Cell Signal **21**(6): 943-953.
- Chua, C. C., N. Rahimi, K. Forsten-Williams and M. A. Nugent (2004). "Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." Circ Res **94**(3): 316-323.



- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-516.
- Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller and T. V. Kurzchalia (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-2452.
- Elfenbein, A., A. Lanahan, T. X. Zhou, A. Yamasaki, E. Tkachenko, M. Matsuda and M. Simons (2012). "Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis." Sci Signal **5**(223): ra36.
- Feng, L., W. X. Liao, Q. Luo, H. H. Zhang, W. Wang, J. Zheng and D. B. Chen (2012). "Caveolin-1 orchestrates fibroblast growth factor 2 signaling control of angiogenesis in placental artery endothelial cell caveolae." J Cell Physiol **227**(6): 2480-2491.
- Fuhrman, B. (2012). "The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis." Atherosclerosis **222**(1): 8-14.
- Gampel, A., L. Moss, M. C. Jones, V. Brunton, J. C. Norman and H. Mellor (2006). "VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment." Blood **108**(8): 2624-2631.
- Gerhardt, H. and H. Semb (2008). "Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis?" J Mol Med (Berl) **86**(2): 135-144.
- Gerwins, P., E. Skoldenberg and L. Claesson-Welsh (2000). "Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis." Crit Rev Oncol Hematol **34**(3): 185-194.
- Grunewald, F. S., A. E. Prota, A. Giese and K. Ballmer-Hofer (2010). "Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling." Biochim Biophys Acta **1804**(3): 567-580.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.
- Holmqvist, K., M. J. Cross, C. Rolny, R. Hagerkvist, N. Rahimi, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh and M. Welsh (2004). "The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration." J Biol Chem **279**(21): 22267-22275.
- Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 117-123.
- Ikeda, S., M. Ushio-Fukai, L. Zuo, T. Tojo, S. Dikalov, N. A. Patrushev and R. W. Alexander (2005). "Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **96**(4): 467-475.
- Irschick, R., T. Trost, G. Karp, B. Hausott, M. Auer, P. Claus and L. Klimaschewski (2013). "Sorting of the FGF receptor 1 in a human glioma cell line." Histochem Cell Biol **139**(1): 135-148.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-693.

- Jopling, H. M., A. F. Odell, C. Pellet-Many, A. M. Latham, P. Frankel, A. Sivaprasadarao, J. H. Walker, I. C. Zachary and S. Ponnambalam (2014). "Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation." Cells **3**(2): 363-385.
- Katoh, M. and H. Nakagama (2014). "FGF receptors: cancer biology and therapeutics." Med Res Rev **34**(2): 280-300.
- Kelleher, F. C., H. O'Sullivan, E. Smyth, R. McDermott and A. Viterbo (2013). "Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease." Carcinogenesis **34**(10): 2198-2205.
- Koch, S. and L. Claesson-Welsh (2012). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(7): a006502.
- Kohsaka, S., K. Hinohara, L. Wang, T. Nishimura, M. Urushido, K. Yachi, M. Tsuda, M. Tanino, T. Kimura, H. Nishihara, N. Gotoh and S. Tanaka (2014). "Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma." Neuro Oncol.
- Kolch, W. and A. Pitt (2010). "Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer." Nat Rev Cancer **10**(9): 618-629.
- Labrecque, L., I. Royal, D. S. Surprenant, C. Patterson, D. Gingras and R. Beliveau (2003). "Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol." Mol Biol Cell **14**(1): 334-347.
- Lajoie, P. and I. R. Nabi (2010). "Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis." Int Rev Cell Mol Biol **282**: 135-163.
- Lamallice, L., F. Houle and J. Huot (2006). "Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF." J Biol Chem **281**(45): 34009-34020.
- Lampugnani, M. G., F. Orsenigo, M. C. Gagliani, C. Tacchetti and E. Dejana (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." J Cell Biol **174**(4): 593-604.
- Lanahan, A. A., K. Hermans, F. Claes, J. S. Kerley-Hamilton, Z. W. Zhuang, F. J. Giordano, P. Carmeliet and M. Simons (2010). "VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis." Dev Cell **18**(5): 713-724.
- Landgren, E., P. Klint, K. Yokote and L. Claesson-Welsh (1998). "Fibroblast growth factor receptor-1 mediates chemotaxis independently of direct SH2-domain protein binding." Oncogene **17**(3): 283-291.
- Lebrin, F., M. Deckers, P. Bertolino and P. Ten Dijke (2005). "TGF-beta receptor function in the endothelium." Cardiovasc Res **65**(3): 599-608.
- Liu, D., J. Aguirre Ghiso, Y. Estrada and L. Ossowski (2002). "EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma." Cancer Cell **1**(5): 445-457.

- Liu, J., P. Oh, T. Horner, R. A. Rogers and J. E. Schnitzer (1997). "Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains." *J Biol Chem* **272**(11): 7211-7222.
- Liu, Y., R. Pixley, M. Fusaro, G. Godoy, E. Kim, M. E. Bromberg and R. W. Colman (2009). "Cleaved high-molecular-weight kininogen and its domain 5 inhibit migration and invasion of human prostate cancer cells through the epidermal growth factor receptor pathway." *Oncogene* **28**(30): 2756-2765.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Massey, K. A. and J. E. Schnitzer (2010). "Caveolae and cancer." *Recent Results Cancer Res* **180**: 217-231.
- Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J. H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland and L. Claesson-Welsh (2005). "VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis." *EMBO J* **24**(13): 2342-2353.
- Milkiewicz, M., E. Ispanovic, J. L. Doyle and T. L. Haas (2006). "Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(3): 333-357.
- Monti, M., S. Donnini, L. Morbidelli, A. Giachetti, D. Mochly-Rosen, P. Mignatti and M. Ziche (2013). "PKCepsilon activation promotes FGF-2 exocytosis and induces endothelial cell proliferation and sprouting." *J Mol Cell Cardiol* **63**: 107-117.
- Murakami, M., A. Elfenbein and M. Simons (2008). "Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis." *Cardiovasc Res* **78**(2): 223-231.
- Nadratowska-Wesolowska, B., E. M. Haugsten, M. Zakrzewska, P. Jakimowicz, Y. Zhen, D. Pajdzik, J. Wesche and A. Wiedlocha (2013). "RSK2 regulates endocytosis of FGF receptor 1 by phosphorylation on serine 789." *Oncogene*.
- Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro and D. S. Salomon (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." *Gene* **366**(1): 2-16.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome Biol* **2**(3): REVIEWS3005.
- Persaud, A., P. Alberts, M. Hayes, S. Guettler, I. Clarke, F. Sicheri, P. Dirks, B. Ciruna and D. Rotin (2011). "Nedd4-1 binds and ubiquitylates activated FGFR1 to control its endocytosis and function." *EMBO J* **30**(16): 3259-3273.
- Pinkas-Kramarski, R., L. Soussan, H. Waterman, G. Levkowitz, I. Alroy, L. Klapper, S. Lavi, R. Seger, B. J. Ratzkin, M. Sela and Y. Yarden (1996). "Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions." *EMBO J* **15**(10): 2452-2467.
- Poettler, M., M. Unseld, J. Mihaly-Bison, P. Uhrin, F. Koban, B. R. Binder, C. C. Zielinski and G. W. Prager (2012). "The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration." *Thromb Haemost* **108**(2): 357-366.
- Potente, M., H. Gerhardt and P. Carmeliet (2011). "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." *Cell* **146**(6): 873-887.

- Prager, G. W., J. M. Breuss, S. Steurer, J. Mihaly and B. R. Binder (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells." Blood **103**(3): 955-962.
- Prager, G. W., J. M. Breuss, S. Steurer, D. Olcaydu, J. Mihaly, P. M. Brunner, H. Stockinger and B. R. Binder (2004). "Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor." Circ Res **94**(12): 1562-1570.
- Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca and M. Rusnati (2005). "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 159-178.
- Presta, M., L. Tiberio, M. Rusnati, P. Dell'Era and G. Ragnotti (1991). "Basic fibroblast growth factor requires a long-lasting activation of protein kinase C to induce cell proliferation in transformed fetal bovine aortic endothelial cells." Cell Regul **2**(9): 719-726.
- Raghu, H., S. S. Lakka, C. S. Gondi, S. Mohanam, D. H. Dinh, M. Gujrati and J. S. Rao (2010). "Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines." PLoS One **5**(8): e12458.
- Raghu, H., P. K. Sodadasu, R. R. Malla, C. S. Gondi, N. Estes and J. S. Rao (2010). "Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells." BMC Cancer **10**: 647.
- Rizzolio, S., N. Rabinowicz, E. Rainero, L. Lanzetti, G. Serini, J. Norman, G. Neufeld and L. Tamagnone (2012). "Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling." Cancer Res **72**(22): 5801-5811.
- Roy, S., R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock and R. G. Parton (1999). "Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains." Nat Cell Biol **1**(2): 98-105.
- Sahores, M., A. Prinetti, G. Chiabrando, F. Blasi and S. Sonnino (2008). "uPA binding increases UPAR localization to lipid rafts and modifies the receptor microdomain composition." Biochim Biophys Acta **1778**(1): 250-259.
- Sakurai, Y., K. Ohgimoto, Y. Kataoka, N. Yoshida and M. Shibuya (2005). "Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1076-1081.
- Sawamiphak, S., S. Seidel, C. L. Essmann, G. A. Wilkinson, M. E. Pitulescu, T. Acker and A. Acker-Palmer (2010). "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis." Nature **465**(7297): 487-491.
- Saylor, P. J., B. Escudier and M. D. Michaelson (2012). "Importance of fibroblast growth factor receptor in neovascularization and tumor escape from antiangiogenic therapy." Clin Genitourin Cancer **10**(2): 77-83.
- Schneider, M. R. and E. Wolf (2008). "The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: insights from rodent models." Cytokine Growth Factor Rev **19**(2): 173-181.
- Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh (2006). "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 549-560.

- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-39.
- Soker, S., S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." Cell **92**(6): 735-745.
- Sorkin, A. and L. K. Goh (2009). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." Exp Cell Res **315**(4): 683-696.
- Stahl, A. and B. M. Mueller (1995). "The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae." J Cell Biol **129**(2): 335-344.
- Staubach, S. and F. G. Hanisch (2011). "Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer." Expert Rev Proteomics **8**(2): 263-277.
- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **109**(3): 227-241.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida and M. Shibuya (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." EMBO J **20**(11): 2768-2778.
- Tang, L. and X. Han (2013). "The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis." Biomed Pharmacother **67**(2): 179-182.
- Threadgill, D. W., A. A. Dlugosz, L. A. Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mourton, K. Herrup, R. C. Harris and et al. (1995). "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." Science **269**(5221): 230-234.
- Tiwari, A., J. J. Jung, S. M. Inamdar, D. Nihalani and A. Choudhury (2013). "The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(5): H687-696.
- Turner, N. and R. Grose (2010). "Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer." Nat Rev Cancer **10**(2): 116-129.
- van Cruijsen, H., G. Giaccone and K. Hoekman (2005). "Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies." Int J Cancer **117**(6): 883-888.
- Walker, F., S. G. Orchard, R. N. Jorissen, N. E. Hall, H. H. Zhang, P. A. Hoyne, T. E. Adams, T. G. Johns, C. Ward, T. P. Garrett, H. J. Zhu, M. Nerrie, A. M. Scott, E. C. Nice and A. W. Burgess (2004). "CR1/CR2 interactions modulate the functions of the cell surface epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **279**(21): 22387-22398.
- Wallasch, C., F. U. Weiss, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing and A. Ullrich (1995). "Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3." EMBO J **14**(17): 4267-4275.

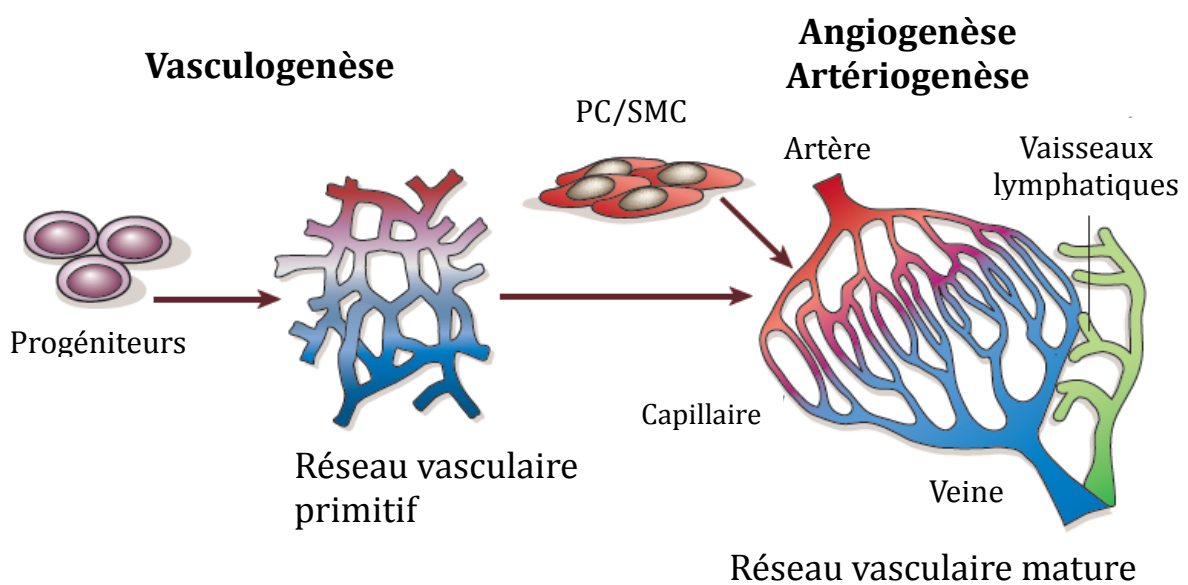
Wang, Y., S. Pennock, X. Chen and Z. Wang (2002). "Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival." Mol Cell Biol **22**(20): 7279-7290.

Warren, C. M. and R. Landgraf (2006). "Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control." Cell Signal **18**(7): 923-933.

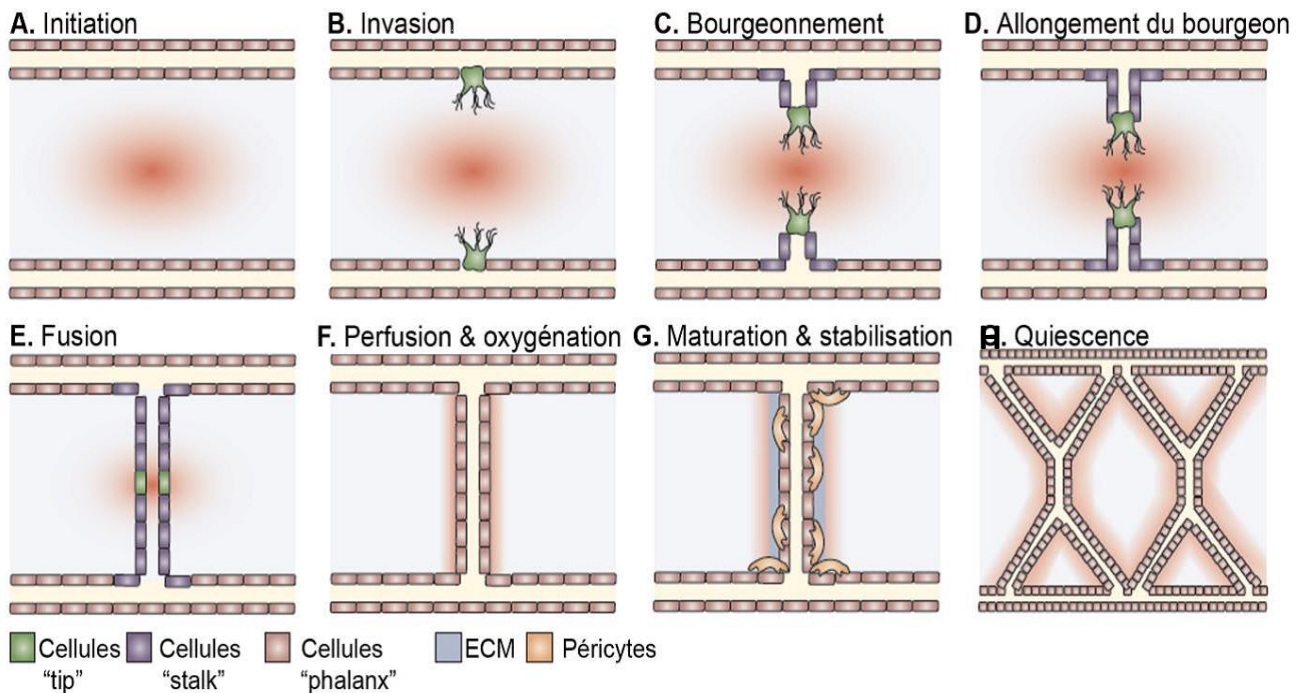
Wiedemann, M. and B. Trueb (2000). "Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors." Genomics **69**(2): 275-279.

Xian, X., J. Hakansson, A. Stahlberg, P. Lindblom, C. Betsholtz, H. Gerhardt and H. Semb (2006). "Pericytes limit tumor cell metastasis." J Clin Invest **116**(3): 642-651.

Yang, Y., M. Sun, L. Wang and B. Jiao (2013). "HIFs, angiogenesis, and cancer." J Cell Biochem **114**(5): 967-974.

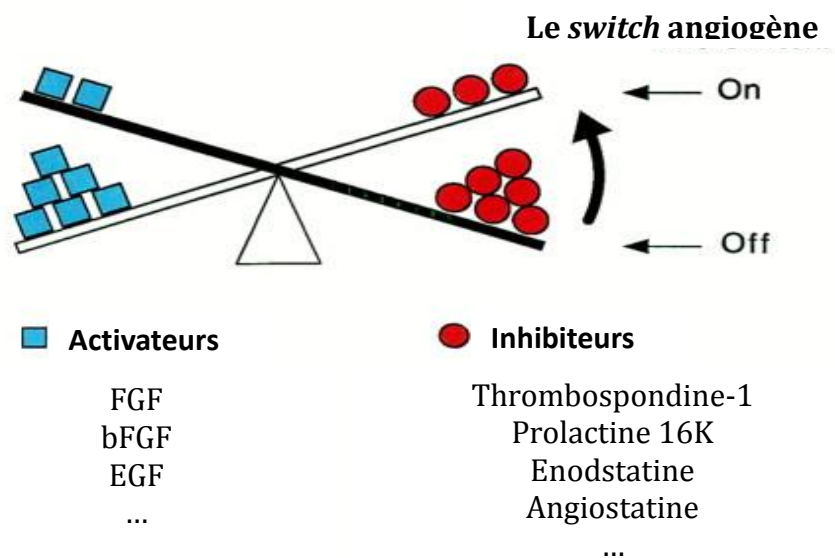


**Figure 1: Schéma du développement du système vasculaire.** Durant la vasculogénèse, les cellules progénitrices se différencient et forment un réseau vasculaire primitif. Durant l'angiogenèse, le réseau s'agrandit et les péricytes (PC) et les cellules musculaires lisses (SMC) sont recrutées. Elles contribuent à la maturation du réseau. Les vaisseaux lymphatiques se différencient à partir des veines. D'après (Carmeliet 2005).

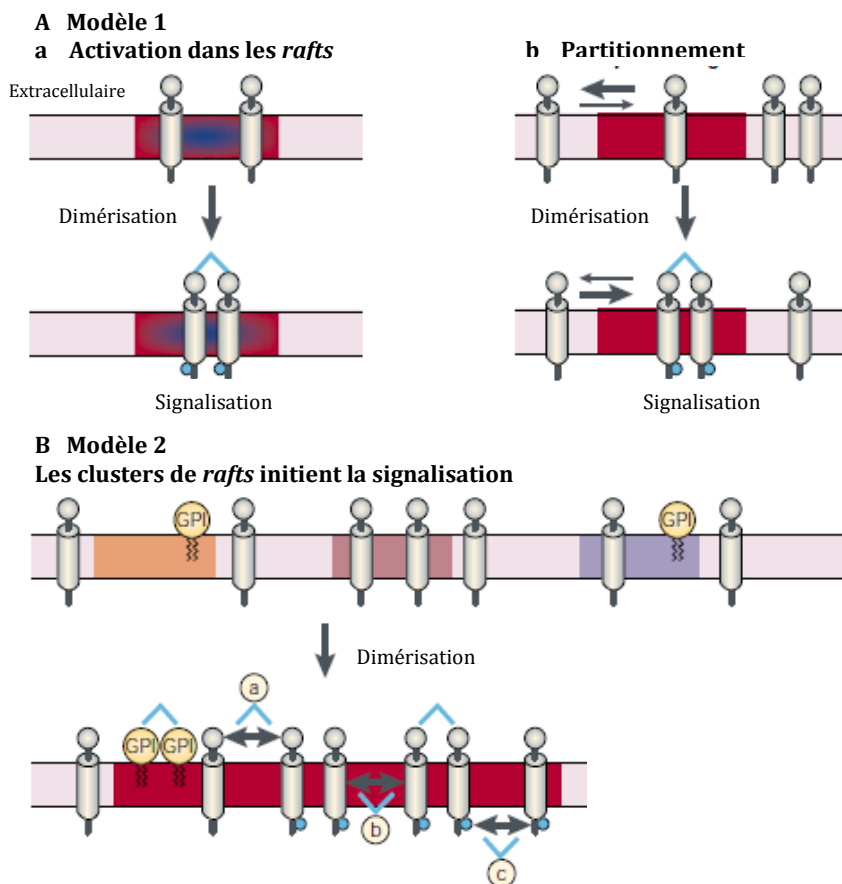


**Figure 2: Formation de nouveaux vaisseaux.** **A.** Réponse à l'hypoxie; les cellules à proximité produisent un gradient de VEGF. **B.** La cellule endothéliale exposée à la plus forte concentration en VEGF se différencie en cellule *tip*. **C.** La cellule *tip* dirige le bourgeonnement et envahit le tissu environnant à l'aide de ses filopodes. **D.** A la base de la cellule *tip*, se différencient les cellules *stalk* dont la prolifération allonge le bourgeon. **E.** La fusion des cellules *tip* permet la connexion des nouveaux vaisseaux. **F.** La lumière du vaisseau est formée et la circulation sanguine est établie. L'oxygénation des tissus diminue la quantité de VEGF. **G.** Le recrutement des cellules murales permet la maturation et la stabilisation du nouveau vaisseau ainsi que le dépôt de la matrice extracellulaire. **H.** Le réseau se complexifie et les cellules endothéliales atteignent un état quiescent (cellules *phalanx*). Figure adaptée de (Carmeliet et al. 2009).



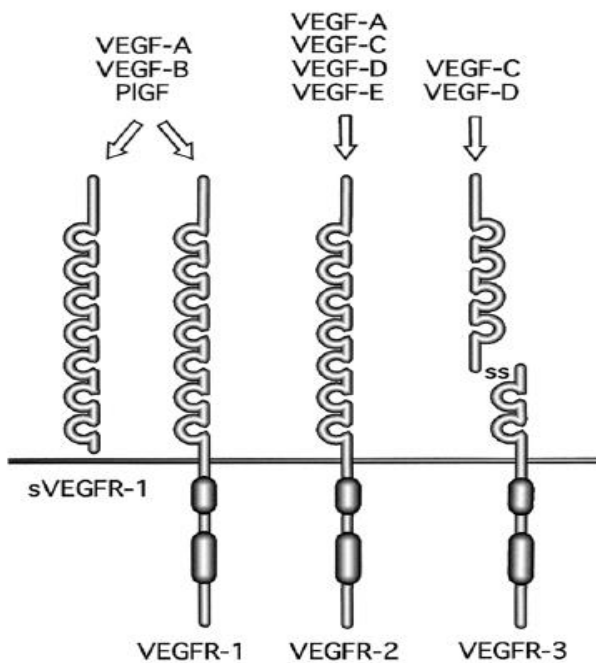


**Figure 3: Le switch angiogène.** La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, à partir du réseau vasculaire quiescent, est déclenchée par l'intermédiaire du mécanisme du *switch* angiogène. Un changement dans l'équilibre de la balance entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse peut activer ce mécanisme. La présence d'activateurs en excès déclenchera l'angiogenèse alors que la présence d'un excès d'inhibiteurs inhibera ce processus. Figure adaptée de (Hanahan and Folkman 1996).

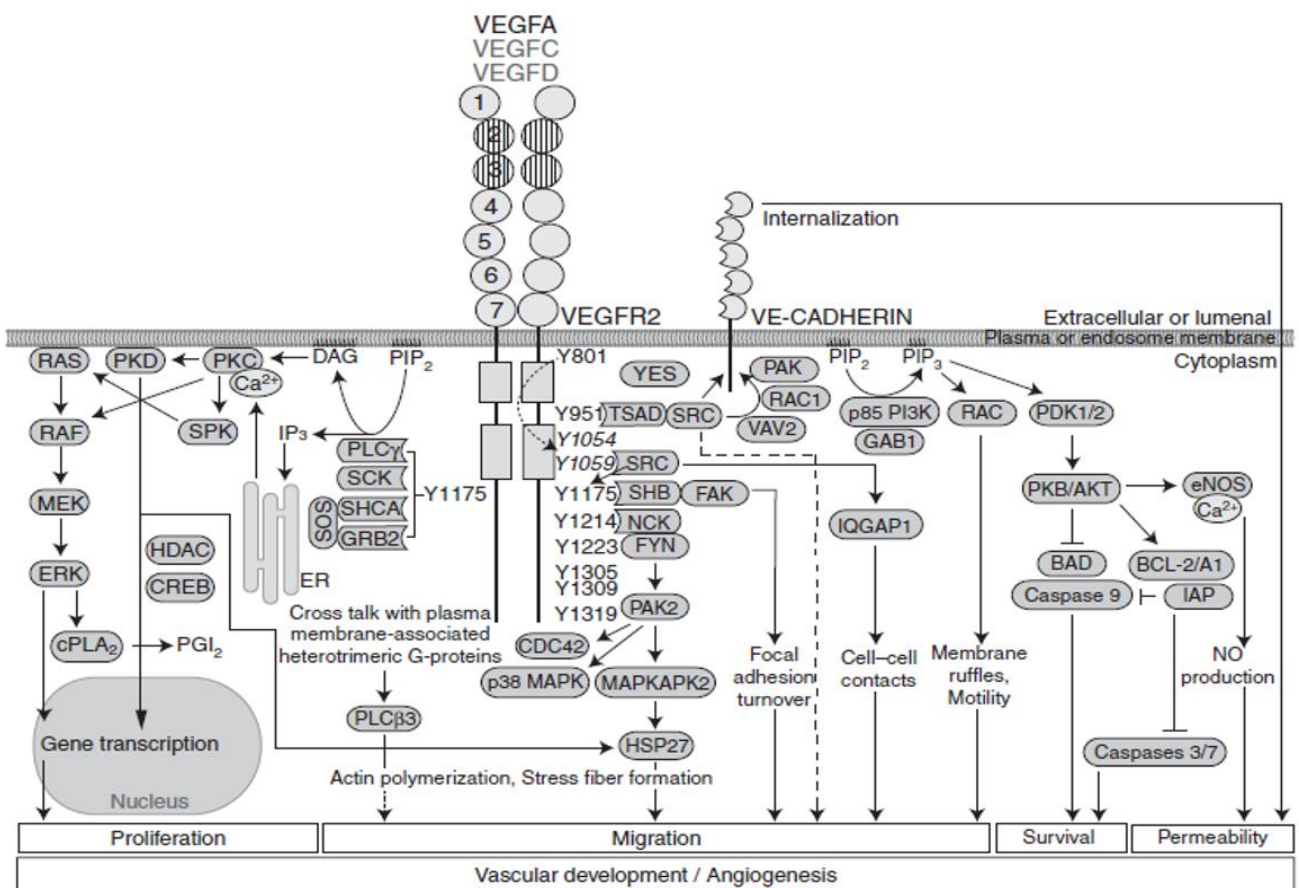


**Figure 4: Hypothèses de la signalisation par les rafts. A. Premier modèle** a. Les récepteurs sont activés et dimérisent (ou oligomérisent) au sein des *rafts* et la signalisation débute. b. Les récepteurs sont activés et dimérisent (ou oligomérisent) à l'extérieur des *rafts*. Cette dimérisation (ou oligomérisation) augmente l'affinité des récepteurs pour les microdomaines. L'arrivée dans les *rafts* enclenche la signalisation intracellulaire.

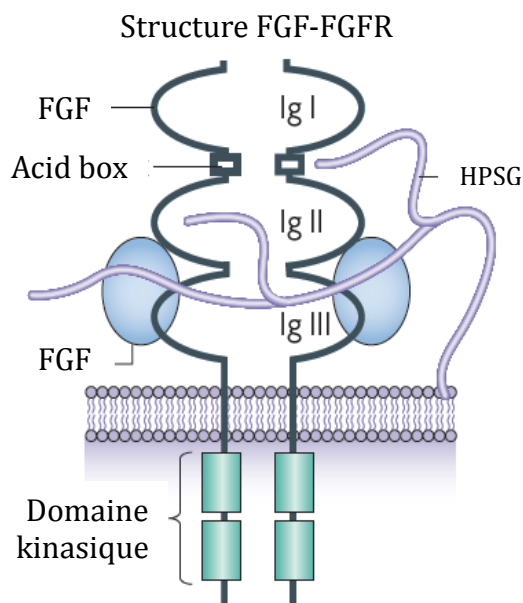
**B. Second modèle.** Plusieurs *rafts* sont présents dans la membrane plasmique et diffèrent par leur composition en protéines (orange, mauve et bleu). L'activation des récepteurs est susceptible de réunir ces différents *rafts* et de former des clusters de grande taille. Ce nouveau *raft* présente alors une composition en protéines, enzymes, et agents de *crosslink* différente des précédents. Figure adaptée de (Simons and Toomre 2000).



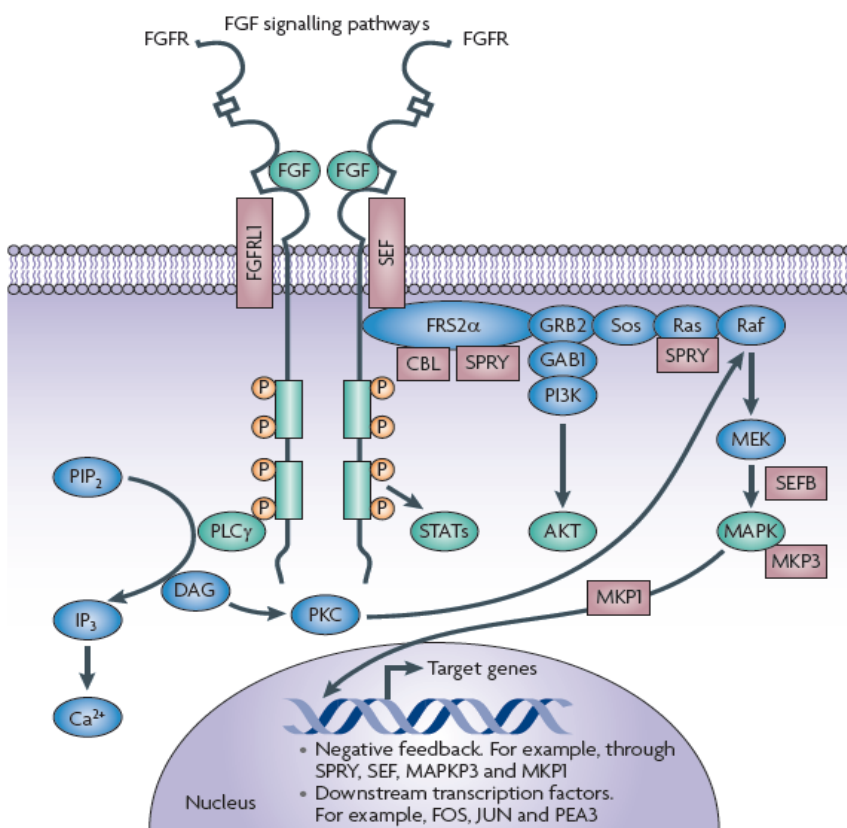
**Figure 5: Représentation schématique des récepteurs du VEGF.** Le VEGF possède 3 récepteurs membranaires: VEGFR1, VEGFR2, et VEGFR3. Les domaines extracellulaires de ces récepteurs sont constitués de répétitions de domaines *immunoglobuline-like*. Seul VEGFR3 possède un pont disulfure dans son domaine extracellulaire. La partie intracellulaire de ces récepteurs est constituée de 2 domaines kinases séparés par des séquences non catalytiques de différentes tailles. Malgré leur structure proche, ces 3 récepteurs n'ont pas les mêmes fonctions. VEGFR1 et VEGFR2 étant impliqués dans l'angiogenèse alors que VEGFR3 régule la lymphangiogenèse. Figure adaptée de (Gerwins et al. 2000).



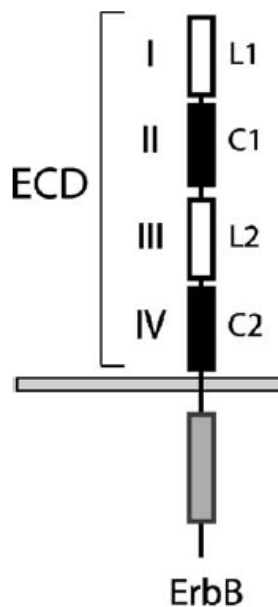
**Figure 6: La signalisation du VEGFR2.** L'organisation des cellules endothéliales afin de maintenir les vaisseaux sanguins nécessite la prolifération, la migration, la survie, et la perméabilité cellulaires. Ces réponses biologiques sont principalement régulées par l'activation du VEGFR2 par le VEGF via un réseau complexe de voies de signalisation intracellulaires. Lors de la liaison du VEGF sur les domaines *immunoglobulines-like* 2 et 3, les molécules de signalisation se fixent sur les tyrosines phosphorylées du domaine intracellulaire et activent les différentes voies de signalisation menant à la réponse physiologique adéquate. D'après (Koch and Claesson-Welsh 2012).



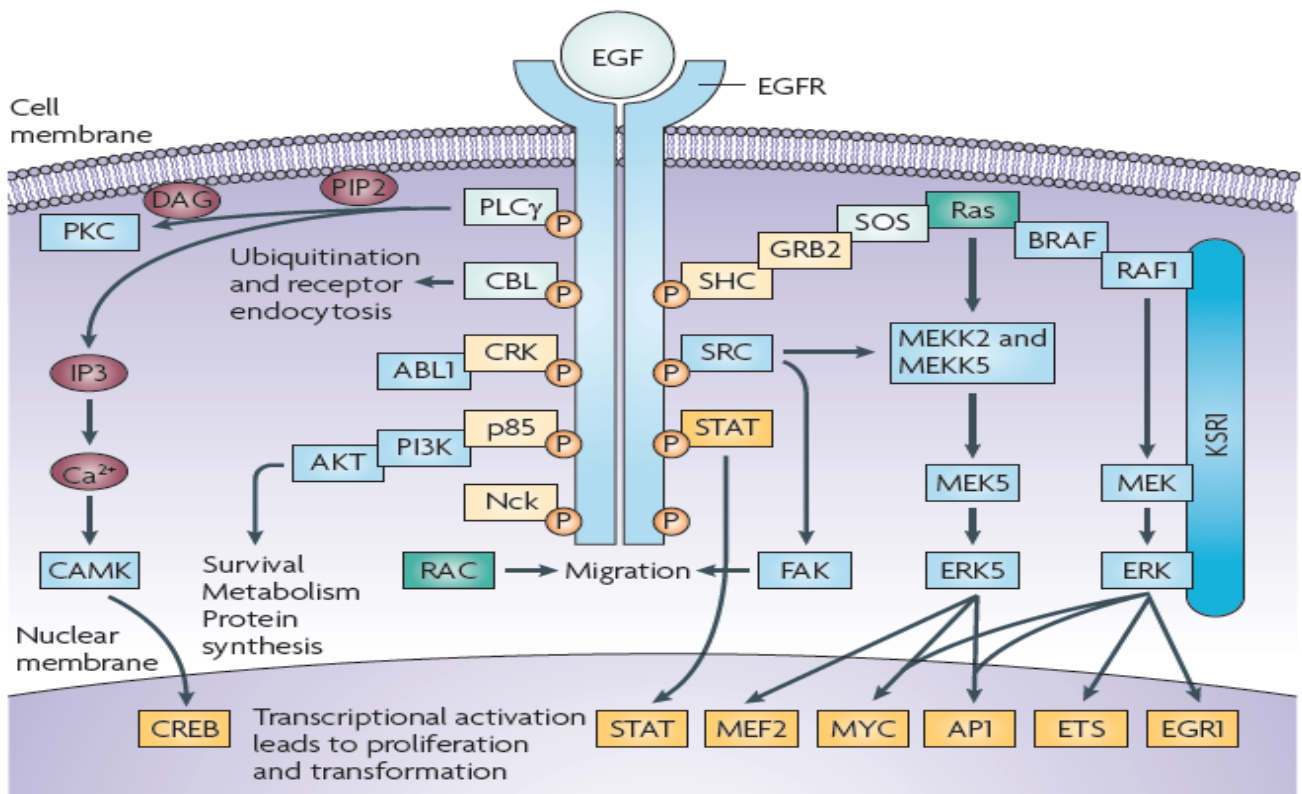
**Figure 7: La structure du FGFR.** La structure de base du complexe FGF-FGFR comprend deux récepteurs, 2 molécules de FGF et un protéoglycan héparane sulfate (HSPG). Le FGF se fixe avec une faible affinité sur le HSPG de la surface cellulaire et avec une forte affinité sur le FGFR. Les récepteurs présentent une structure similaire à celle du VEGFR. Elle comprend 3 domaines extracellulaires de type *immunoglobuline-like*, un simple segment transmembranaire et un domaine intracellulaire comprenant deux domaines kinases. Les deuxième et troisième boucles immunoglobuline du récepteur constituent le site de liaison des ligands FGF. Le domaine liant le HSPG est distinct de celui liant le FGF. Cette famille contient plus de 18 FGF et 4 récepteurs (FGFR1, 2, 3, et 4). Figure adaptée de (Turner and Grose 2010).



**Figure 8: Le réseau de signalisation de FGFR.** Suite à la liaison du ligand sur son récepteur, il y a dimérisation de ce dernier. Les domaines kinases se transphosphorylent et s'autophosphorylent menant à la liaison de molécules adaptatrices. Quatre voies de signalisation peuvent alors être activées: RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT, STAT et la phospholipase  $C\gamma$  (PLC  $\gamma$ ). D'après (Turner and Grose 2010).

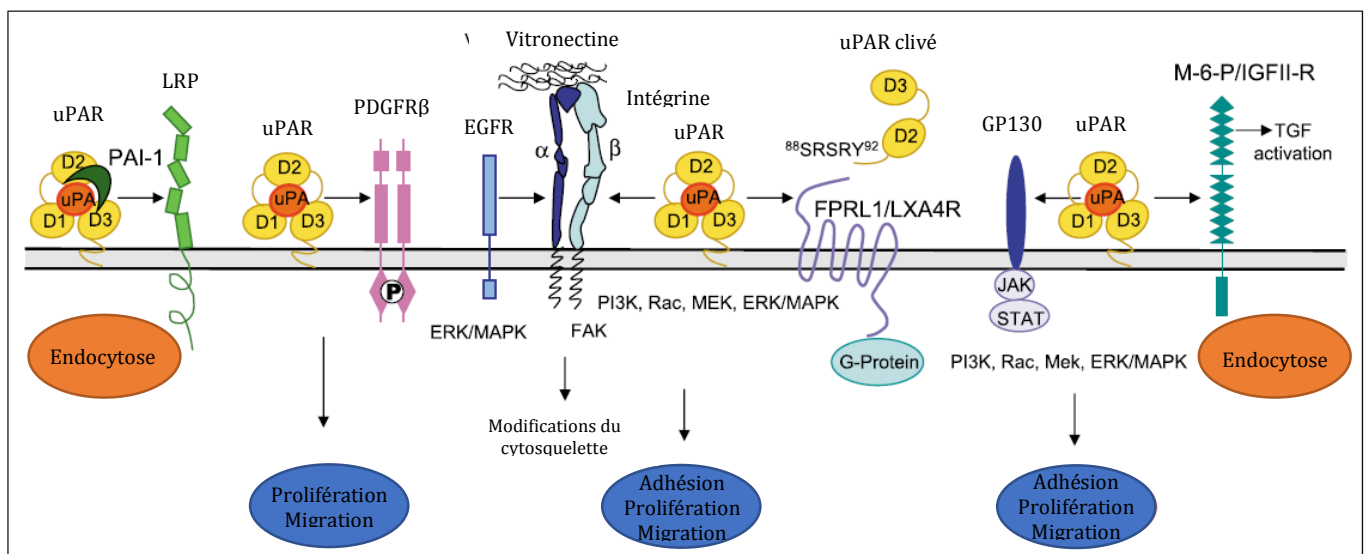


**Figure 9: Organisation des récepteurs ErbB.** Les récepteurs ErbB présentent 4 domaines extracellulaires (I à IV). Les domaines I et III sont également nommés L1 et L2, respectivement. Les domaines II et IV sont également nommés C1 et C2. Ces deux domaines sont considérés comme des domaines riches en cystéines. La liaison du ligand est possible grâce aux domaines I et III. Ces récepteurs partagent également un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire contenant les tyrosines responsables de l'activité kinasique. Figure adaptée de (Warren and Landgraf 2006).

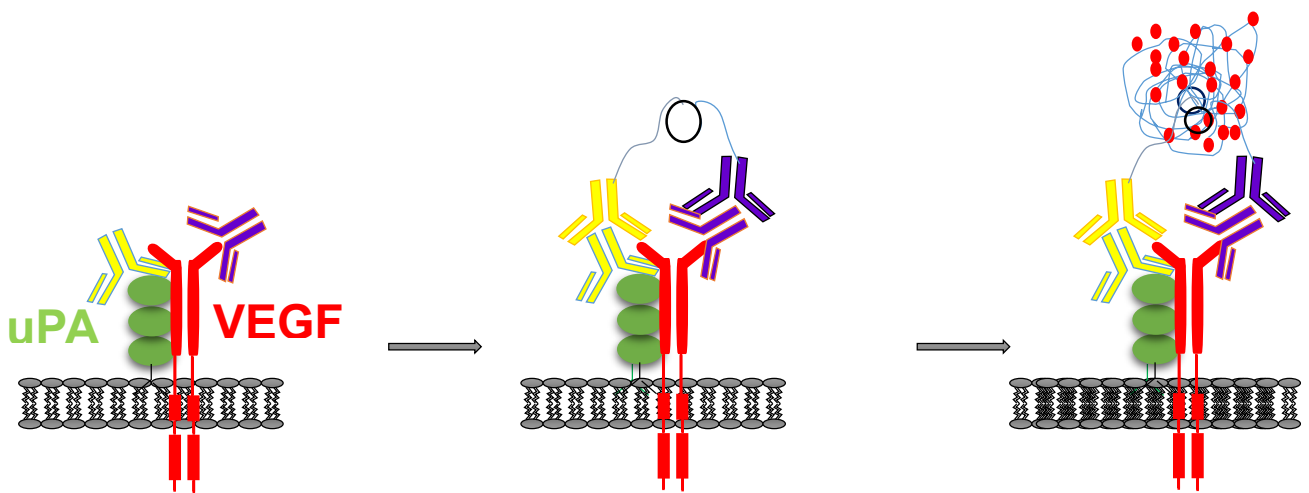


**Figure 10: Le réseau de signalisation d'EGFR.** Suite à la liaison de son ligand, l'EGFR autophosphoryle les tyrosines de son domaine cytoplasmique. Celles-ci servent alors de sites d'accrochage pour divers complexes protéiques nécessaires à la transduction du signal initiée par l'EGF. Ces complexes permettent l'établissement d'une réponse biologique. Parmi les voies activées par EGFR, il y a celle de la kinase Src menant à l'induction de la migration cellulaire. La voie RAS-RAF-MAPK peut aussi être activée afin de réguler la prolifération cellulaire. La phospholipase-Cy (PLCγ) peut également se fixer sur une tyrosine phosphorylée et moduler la prolifération cellulaire par l'intermédiaire du métabolisme du calcium. Enfin, la voie Akt permet de moduler la survie des cellules. Cette voie nécessite l'intervention de la PI3 Kinase. Donc, par l'intermédiaire de ces tyrosines phosphorylées, et des différentes voies de signalisation associées, EGFR peut moduler la prolifération, la migration mais également la survie cellulaires. D'après (Kolch and Pitt 2010).

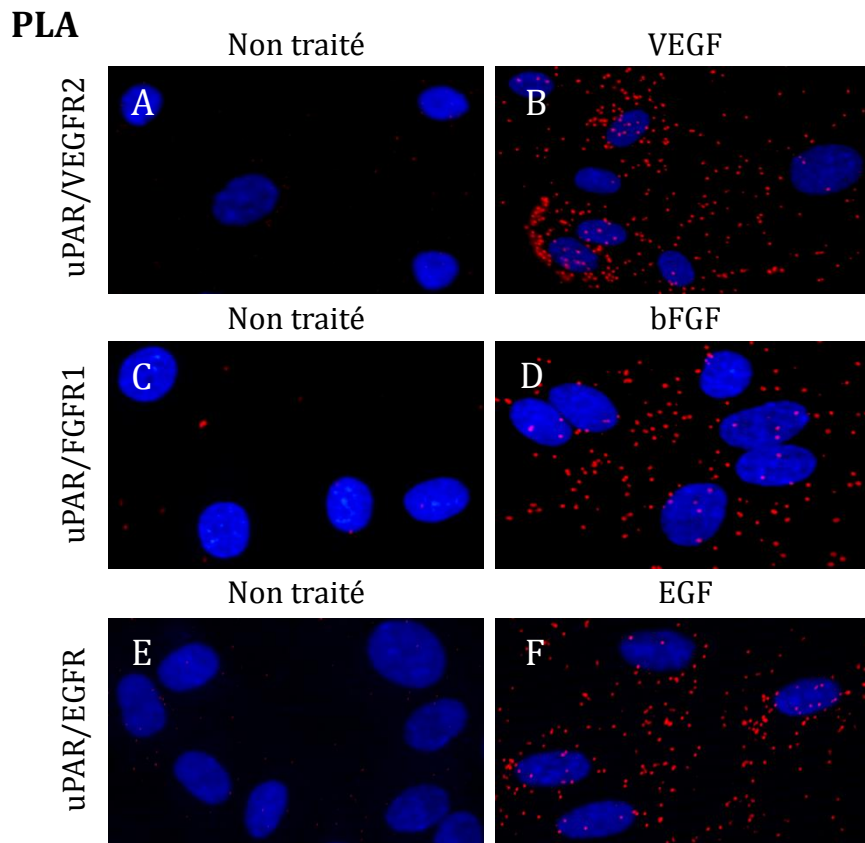




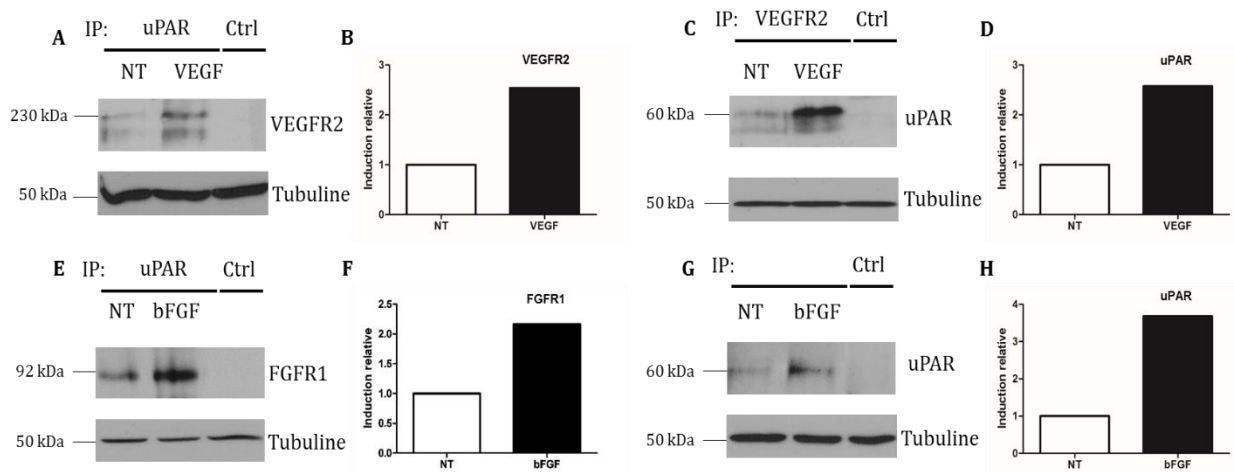
**Figure 11: Schéma récapitulatif des différentes interactions d'uPAR menant aux différentes voies de signalisation. D'après (Binder et al. 2007).**



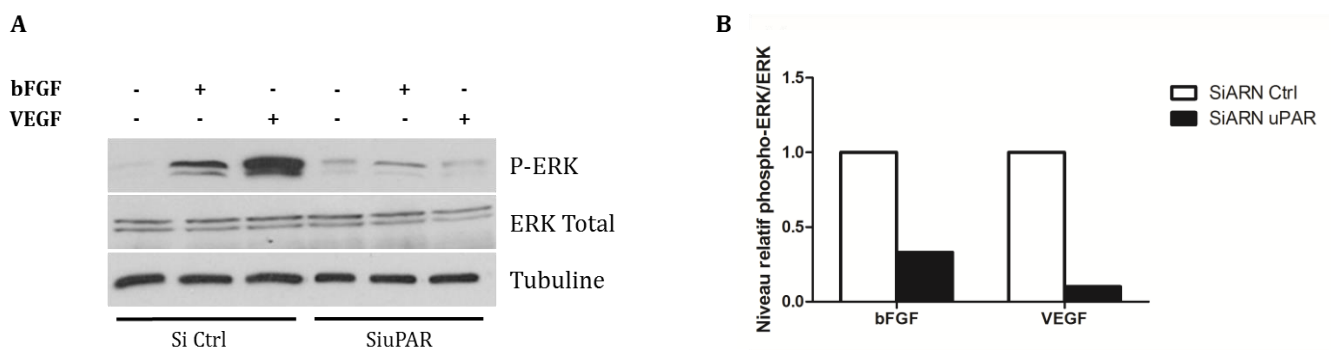
**Figure 12: Principe du *Proximity Ligation Assay* (PLA).** Les deux protéines d'intérêts sont marquées à l'aide d'anticorps primaires provenant de deux espèces différentes. Ces anticorps sont alors reconnus par des anticorps secondaires couplés à des sondes ADN (PLA plus et minus). Si les protéines sont suffisamment proches l'une de l'autre (distance inférieure à 40 nm), une étape de ligation permet de former un cercle d'ADN fermé entre les deux sondes. Une étape d'amplification en *rolling circle* est ensuite réalisée et le produit de cette amplification est marqué à l'aide de sondes fluorescentes, faisant apparaître des points rouges.



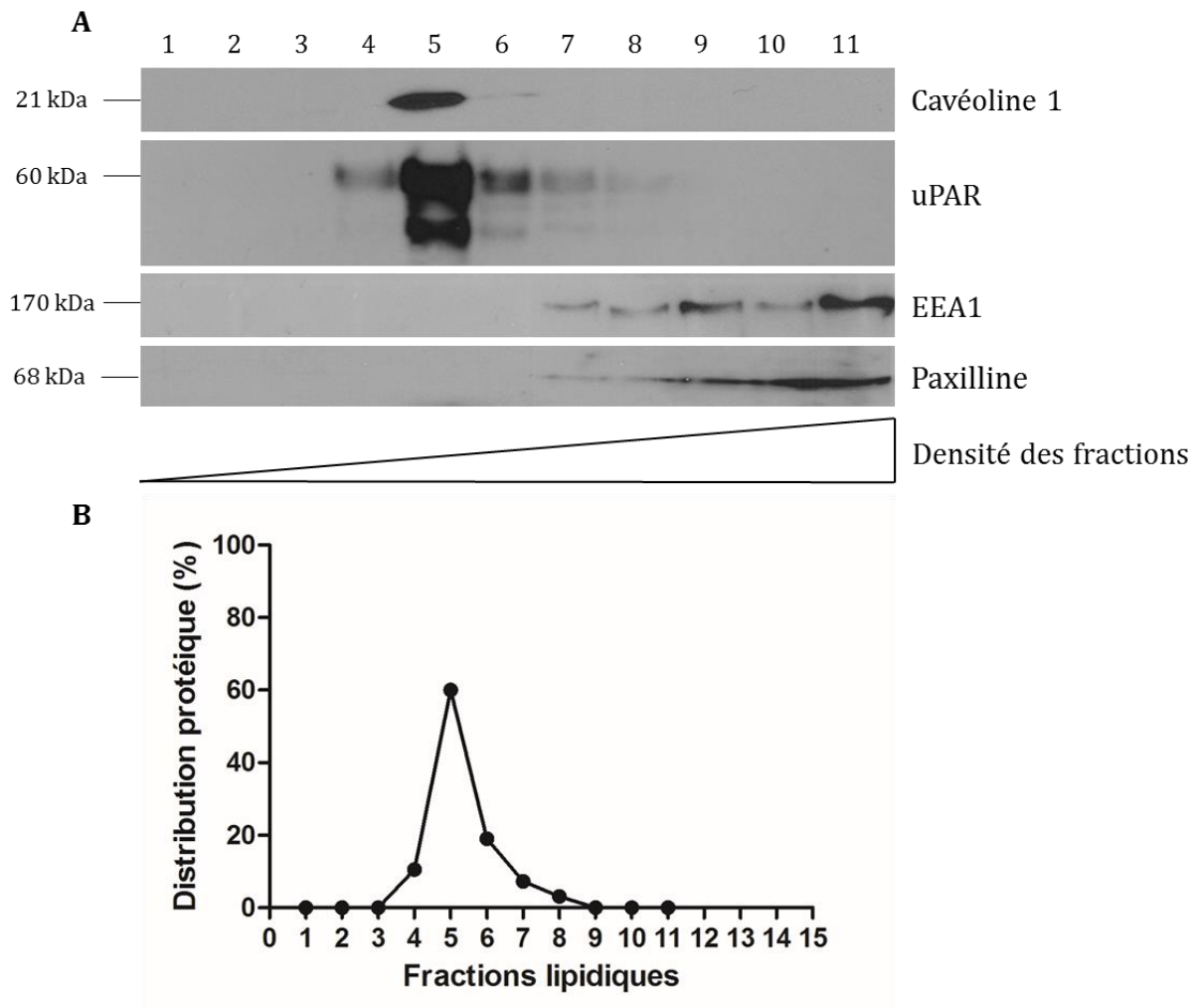
**Figure 13: Le VEGF, le bFGF et l'EGF induisent respectivement la formation des complexes uPAR/VEGFR2, uPAR/FGFR1 et uPAR/EGFR à la membrane des cellules HUVEC.** Observation au microscope à fluorescence des cellules HUVEC non perméabilisées après un marquage Duolink 2 des complexes uPAR/VEGFR2, uPAR/FGFR1 et uPAR/EGFR. Les cellules sont A), C) et E) non traitées; B) traitées au VEGF-A (50 ng/ml); D) traitées au bFGF (20 ng/ml); F) traitées à l'EGF (30 ng/ml) pendant 10 minutes. Les noyaux apparaissent en bleu après coloration au DAPI et les points rouges correspondent aux complexes. Grossissement 40X.



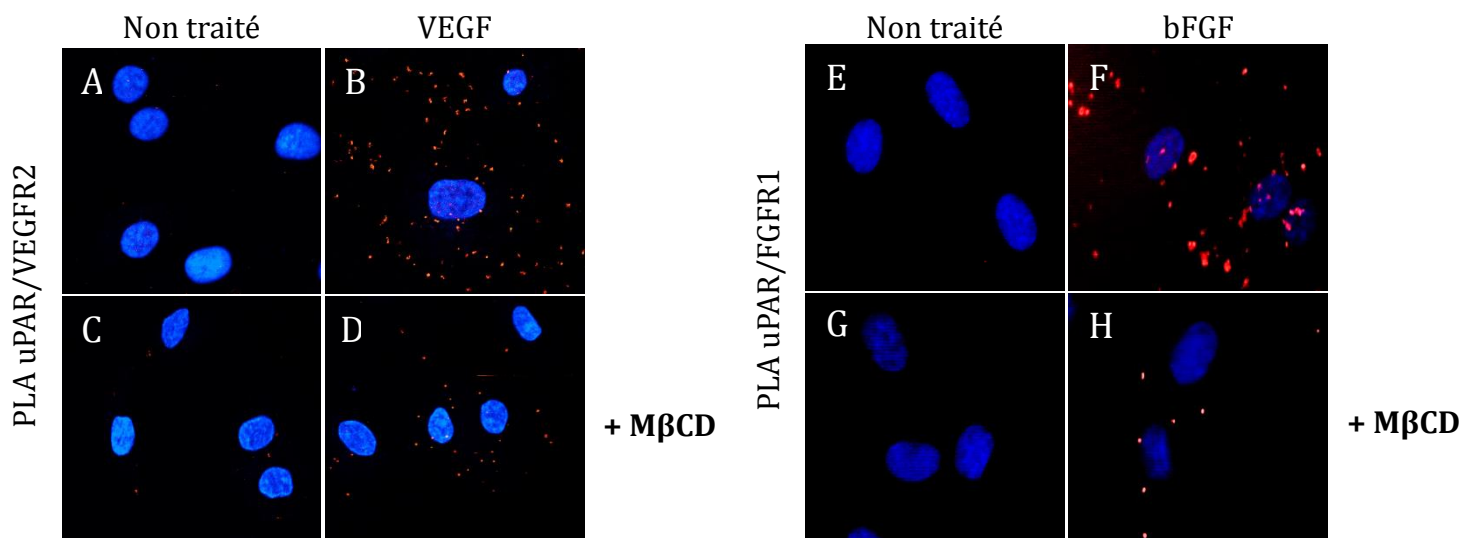
**Figure 14: Le VEGF et le bFGF induisent respectivement la formation des complexes uPAR/VEGFR2 et uPAR/FGFR1 à la membrane des cellules HUVEC.** Immunoprécipitations réalisées sur les extraits protéiques de cellules HUVEC non traitées (NT) ou traitées soit au VEGF (50 ng/ml) soit au bFGF (20 ng/ml) pendant 10 minutes. Les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation sont un anticorps anti-uPAR (A et E), un anticorps anti-VEGFR2 (C) ou un anticorps anti-FGFR1 (G). Les protéines immunoprécipitées sont analysées par Western blotting. A) La révélation est effectuée avec un anticorps anti-VEGFR2. E) La révélation est effectuée avec un anticorps anti-FGFR1. C) et G) La révélation est effectuée avec un anticorps anti-uPAR. Des contrôles de chargement sont effectués, sur le surnageant des cellules, en utilisant un anticorps ciblant la tubuline  $\beta$ . Un contrôle pour s'assurer de la validité de nos anticorps a été réalisé avec des IgG de lapin (Ctrl). B), D), F) et H) Quantification des complexes formés avec ou sans traitements par densitométrie (ImageJ). Normalisation par rapport au non traité.



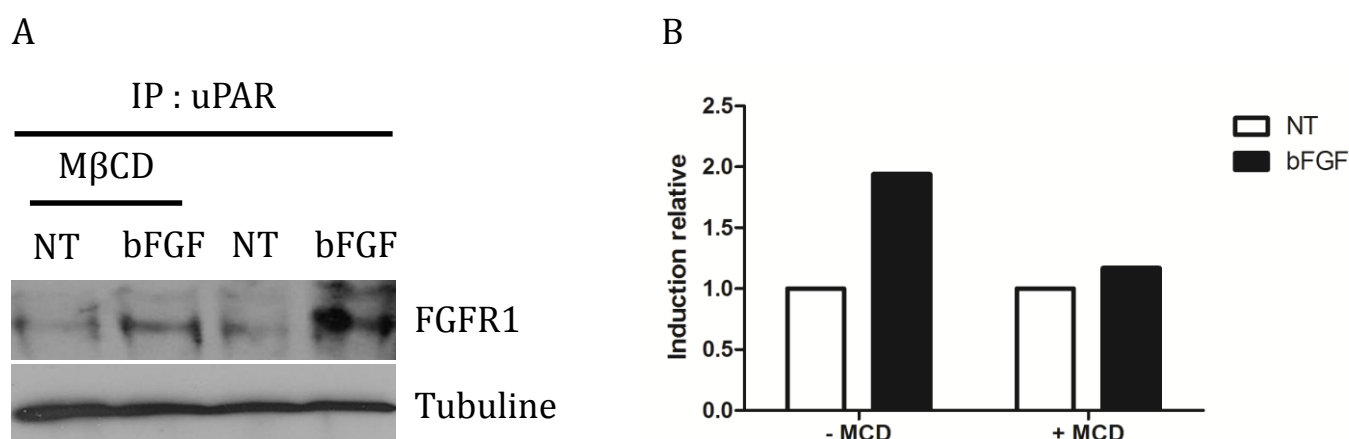
**Figure 20: Le bFGF et le VEGF requiert l'uPAR pour induire la phosphorylation des ERK dans les cellules endothéliales.** Les cellules HUVEC ont été transfectées pendant 72h soit avec un siARN contrôle soit avec un siARN ciblant l'uPAR (50 nM). Les extraits protéiques des cellules transfectées traitées ou non avec du bFGF (20 ng/ml) et du VEGF (50 ng/ml) sont analysés A) par Western blotting en utilisant un anticorps ciblant phospho-ERK (P-ERK). Le chargement est contrôlé grâce à un anticorps anti-tubuline. B) Quantification, par densitométrie, de la phosphorylation relative des ERK dans les cellules transfectées avec un siARN contrôle ou un siARN uPAR (ImageJ). Le ratio P-ERK/ERK est normalisé par rapport au siARN Ctrl.



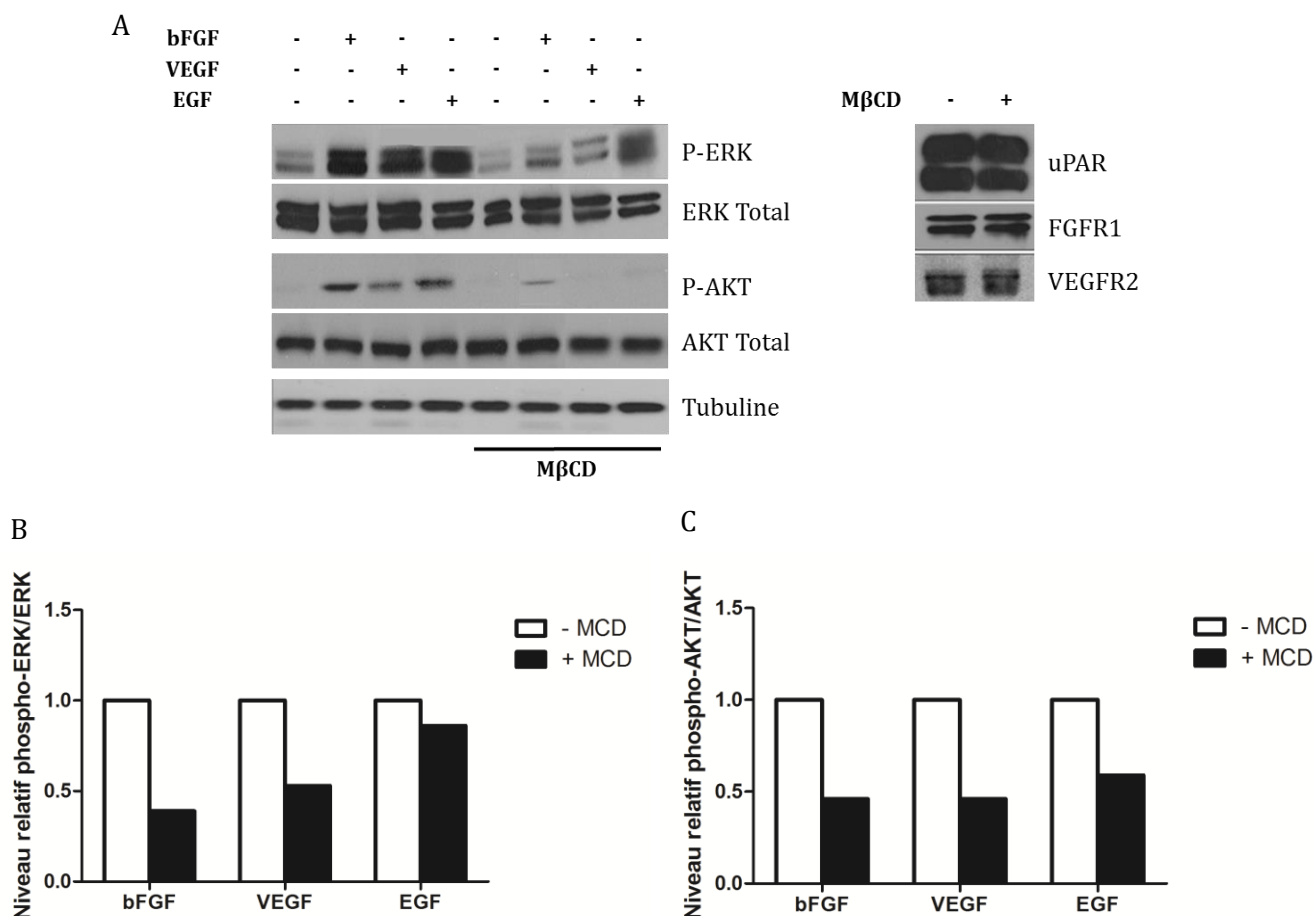
**Figure 21: L'uPAR est localisé dans les *lipid rafts* à la surface des cellules endothéliales HUVEC.** Les cellules endothéliales ont été soumises à une ultracentrifugation sur gradients de saccharose afin d'isoler les *lipid rafts*. A) Analyse de la distribution d'uPAR au sein de ces fractions par Western blotting. La cavéoline-1 sert de marqueur des fractions *rafts*. EEA1 sert de marqueur des endosomes et Paxilline sert de marqueur des fractions dites non *rafts*. B) Quantification de la distribution d'uPAR dans les fractions lipides des HUVEC par densitométrie (ImageJ).



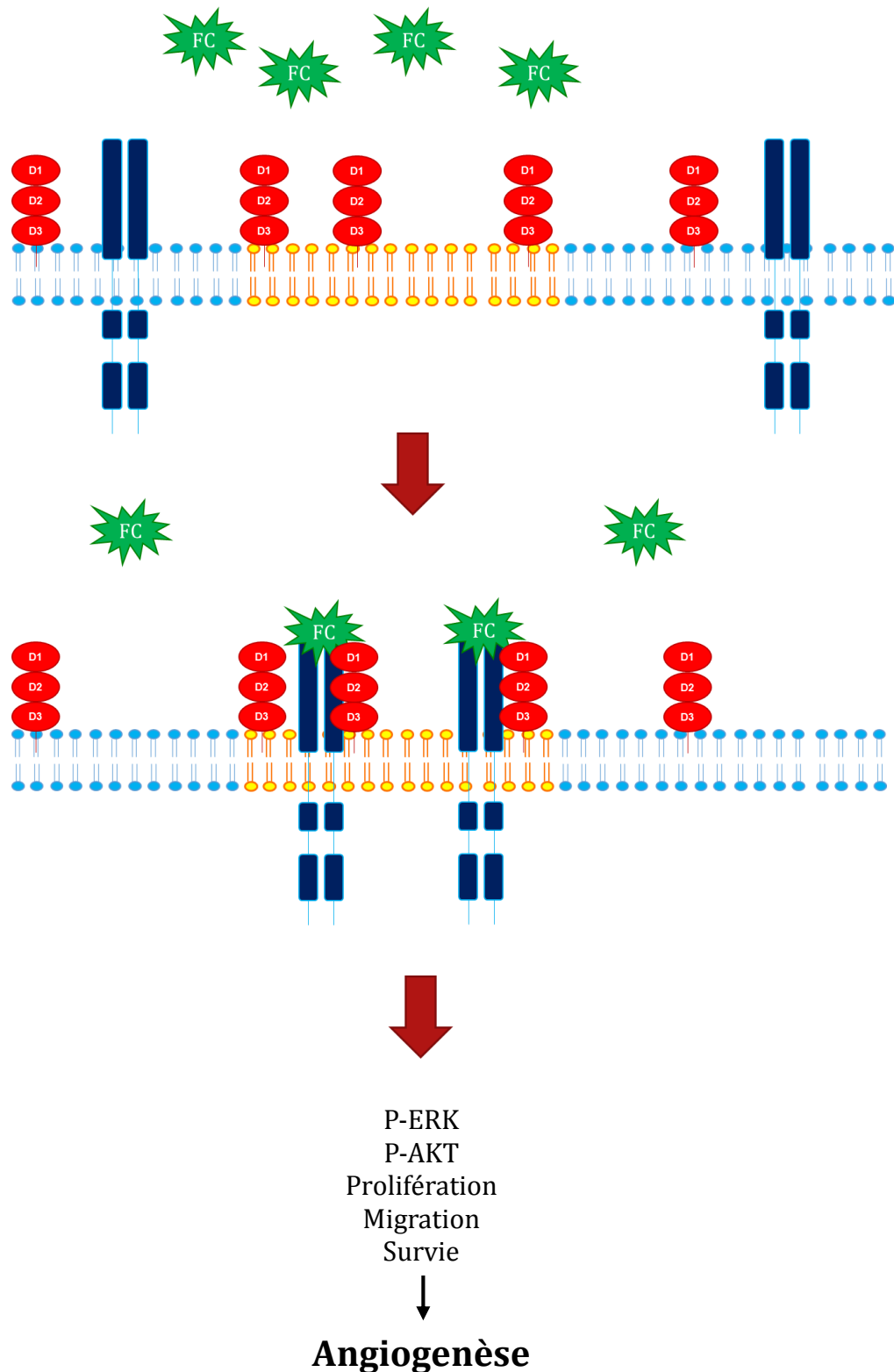
**Figure 24: Les *lipid rafts* sont requis pour l'induction de la formation des complexes uPAR/FGFR1 et uPAR/VEGFR2 par le bFGF et le VEGF, respectivement.** Observation au microscope à fluorescence des cellules HUVEC non perméabilisées après un marquage Duolink 2 des complexes uPAR/VEGFR2, uPAR/FGFR1. Les cellules sont A), C), E) et G) non traitées par les facteurs; B) et D) traitées au VEGF (50 ng/ml); F) et H) traitées au bFGF (20 ng/ml) pendant 10 minutes; C), D), G), H) après un pré-traitement d'1 heure à la méthyl-β-cyclodextrine (10 mM). Les noyaux apparaissent en bleu après coloration au DAPI et les points rouges correspondent aux complexes. Grossissement 40X.



**Figure 25: Les *lipid rafts* sont requis pour l'induction de la formation des complexes uPAR/FGFR1 par le bFGF.** A) Immunoprécipitation réalisée sur les extraits protéiques de cellules HUVEC non traitées (NT) ou traitées au bFGF (20 ng/ml) pendant 10 minutes. Les cellules sont pré-traitées ou non avec de la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) (10 mM) pendant 1 heure. L'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation est un anticorps anti-uPAR. Les protéines immunoprécipitées sont analysées par Western blotting. La révélation est effectuée avec un anticorps anti-FGFR1. Un contrôle de chargement est effectué en utilisant un anticorps ciblant la tubuline β. B) Quantification du complexe formé avec ou sans traitement à la MCD, par densitométrie (ImageJ). Normalisation par rapport au non traité. MCD, méthyl-β-cyclodextrine.



**Figure 26: La destruction des *lipid rafts* diminue l'activation de la voie des ERK et d'AKT par le bFGF, le VEGF et l'EGF.** Les extraits protéiques des cellules endothéliales HUVEC non traitées (NT) et traitées à la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (10 mM) pendant une 1 heure, suivi d'un traitement, de 10 minutes, au bFGF (20 ng/ml), au VEGF (50 ng/ml) et à l'EGF (15 ng/ml), sont analysés par A) Western blotting à l'aide d'anticorps anti-phospho ERK et anti-phospho AKT. Un contrôle de chargement a été effectué avec un anticorps ciblant la tubuline. D'autres contrôles ont été réalisés sur les extraits en utilisant des anticorps anti-ERK, anti-AKT, anti-uPAR, anti-FGFR1 et anti-VEGFR2 afin de s'assurer que la diminution observée n'est pas due à une diminution des récepteurs suite aux différents traitements. B) et C) Quantification du niveau relatif de phospho-ERK (P-ERK) et de phospho-AKT (P-AKT) avec ou sans traitement à la MCD, par densitométrie (ImageJ). Le ratio P-ERK/ERK et P-AKT/AKT est normalisé par rapport aux extrait protéiques non traité à la MCD. MCD, méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.



**Figure 27: Modèle du mécanisme d'action des facteurs de croissance.** La stimulation et donc la fixation du facteur de croissance sur son récepteur engendre une redistribution de celui-ci au sein des microdomaines membranaires appelés les *lipid rafts* et permet l'interaction de l'uPAR avec son récepteur. Ces complexes localisés au sein des *rafts* sont capables de transmettre leur signal par l'intermédiaire de divers adaptateurs menant à l'activation des voies ERK et AKT et à la stimulation de la prolifération, de la migration et de la survie cellulaires. Tous ces éléments contribuent à l'induction de l'angiogenèse.